UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

Année 1965. Série U - N° 422

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Paris
(Mention Pharmacie)

par

Marianne HERMANN

Présentée et soutenue publiquement le :

LES METHODES RAPIDES
DE DETECTION ET DE DENOMBREMENT
DES BACTERIES VIABLES DE L'AIR.

Jury : Melle LAMBIN Président.
GERMAN } Examinateurs.
DESVIGNES }

EDITIONS A. G. E. M. P. - 8, rue Dante - PARIS Ve

UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

Année 1965. Série U - N° 422

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Paris
(Mention Pharmacie)

par

Marianne HERMANN

Présentée et soutenue publiquement le :

LES METHODES RAPIDES
DE DETECTION ET DE DENOMBREMENT
DES BACTERIES VIABLES DE L'AIR.

Jury : Melle LAMBIN Président.
GERMAN
DESVIGNES } Examinateurs.

EDITIONS A. G. E. M. P. - 8, rue Dante - PARIS Ve

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM.	G. VALETTE. O .※.C.Q Ord. Nat. du Mérite	*Doyen*
	MM. JANOT. O ※ .C.Q.....	*Assesseur*
	P. MALANGEAU. O.Q.....	*Assesseur*
	L. RODINEAU. ※ O.Q.....	*Secrétaire Général*
Mme	S. FERRARI. Q.....	*Attachée Principale*
	M. L. ESPINASSE. O.Q.....	*Attachée*
M.	L. JEANDEL. O.Q.....	*Attachée*
Mme	C. PEILLON.....	*Attachée*
Mme	G. RENNETEAU.....	*Attachée*
M.	A. BRENN. ※.....	*Attaché*
Mle	G. BIDEAU.....	*Secrétaire*
Mme	S. CERTAIN. O.Q.....	*Secrétaire*
	M. COUSIN.....	*Secrétaire*
M.	A. DROUILLY. O.Q.....	*Secrétaire*
Mme	T. ROUVEURE.....	*Secrétaire*
Mme	L. WARNESSON. Q.....	*Secrétaire*

DOYEN HONORAIRE

M.	R. FABRE. C ※ C.Q.....	*Membre de l'Institut*

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.	M. DELEPINE. C. ※. C. Q	*Membre de l'Institut*
	L. LAUNOY. O. ※. O. Q.....	
	P. FLEURY. O. ※. C. Q.....	
	M. PICON. O .※ . O .Q	
	C. BEDEL. ※ . O . Q.....	
	R. FABRE. C . ※ . C . Q	*Membre de l'Institut*

PROFESSEURS

MM.	M. M. JANOT. O .✻ .C .Q.....	*Pharmacie galénique (T)*
	G. VALETTE. C . ✻ . C . Q Ord. Nat. du Mérite	*Pharmacodynamie (T)*
	R. PARIS. ✻ .C..Q.....	*Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)*
	M. GUILLOT. ✻ . O .Q	*Physique (T)*
	J.A. GAUTIER. ✻ . O .Q	*Chimie organique (T)*
Mle	S. LAMBIN. ✻ .O .Q	*Microbiologie (T)*
MM.	Y. RAOUL. ✻ .O .Q.....	*Physiologie (T)*
	J. COURTOIS. ✻ . O .Q	*Chimie biologique (T)*
	L. DOMANGE. ✻ . C . Q	*Chimie minérale (T)*
	P. CRETE. ✻ . O .Q.....	*Botanique (T)*
	R. TRUHAUT. O .✻ . O . Q.....	*Toxicologie et Hygiène industrielle (T)*
	A. MORETTE. ✻ . O . Q	*Hydrologie (T)*
	R. CAVIER. O . Q	*Parasitologie (T)*
	A. QUEVAUVILLER. ✻ . O . Q	*Hygiène et Education Sanitaire (T)*
	R. MOREAU. ✻ . O . Q	*Pharmacie chimique (T)*
	A. GERMAN. O . Q	*Virologie et Sérologie (T)*
	M. PIETTE. ✻ . O . Q	*Biologie sanguine (T)*
	P. MALANGEAU. O . Q	*Chimie analytique (T)*
	M. GIRARD. O . Q	*Biochimie appliquée (T)*
	G. DILLEMANN.....	*Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)*
	G. DEYSSON. O . Q.....	*Cytologie végétale (T)*
	J. FLAHAUT. Q.....	*Minéralogie (T)*
	C. BOUDENE.....	*Toxicologie et Hygiène industrielle (T)*
	J. RENAULT. Q.....	*Chimie organique (T)*
	A. LE HIR.....	*Pharmacie galénique*
	P. LARUELLE.....	*Physique*
	P. ROSSIGNOL.....	*Pharmacodynamie*
	A. MANGEOT. O . Q	*Pharmacie galénique industrielle*
	P. DELAVEAU.....	*Matière médicale*
	Y. COHEN.....	*Sciences naturelles*
	H. RENAULT.....	*Physique*
M.	R. BOURDON.....	*Chimie analytique*
M.	P. REYNAUD.....	*Sciences Physico-chimiques*

MAITRES DE CONFERENCES

	G. LE MOAN.....	*Sciences appliquées*
	C. PAOLETTI.....	*Sciences appliquées*
	J. POISSON.....	*Sciences naturelles*
	A. DESVIGNES. Q.....	*Cryptogamie et technique bactériologique*
	F. PERCHERON.....	*Sciences appliquées*
	J. SAVEL.....	*Biologie animale*
	J. BORY. Q.....	*Sciences naturelles*
	M. MIOCQUE.....	*Chimie organique*
	J. L. GUIGNARD.....	*Botanique générale*
	J. C. GOUNELLE.....	*Sciences naturelles*
	P. BINET.....	*Biologie animale et Zoologie*
	C. COMBET-FARNOUX.....	*Chimie organique*
Mme	M. PLAT.....	*Sciences appliquées*
MM.	E. DELACOUX.....	*Sciences physico-Chimiques*
	J. DIDRY (F.F.).....	*Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales*

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

Mme	J. BLANC (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A. N)*
MM.	A. CARLIER (F.F.).....	*C.E.S. Pharmacie galénique Industrielle*
	J. CHARLES (F.F.).....	*Mathématiques*
	C. DAGRON (F.F.).....	*Chimie préparation (1re A. N)*
Mle	M. T. DECAUDIN (F.F.).....	*Biologie animale (3e A.).*
M.	C. DREUX (F.F.).....	*C.E.S. Electrochimie appliquée à l'analyse*
Mle	G. DUMANT (F.F.).....	*Chimie préparations (1re A. N)*
MM.	P. GEORGES (F.F.).....	*C.E.S. Parasitologie*
	P. GESTEAU. ✲ . O . Q.....	*C.E.S. Biochimie*
Mle	M. J. GOURSAT (F.F.).....	*Chaire de botanique*
MM.	H. GUERIN. ✲ . O . Q.....	*Biologie végétale (3e A)*
	M. GUERNET.....	*Chimie (2e et 3e années)*
	M. HAMON. (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A. N)*
	J. HARISPE. ✲ O . Q.....	*Chimie préparations (1re A)*
	G. HAZEBROUCQ (F.F.).....	*Physique*

M.	J. HENRY.....	*Chimie (4e Année)*
Mme	J. HUBERT.....	*C.E.S. Bactériologie*
Mme	M. J. HURON (F.F.).....	*Mathématiques*
M.	Y. LAROCHE.....	*Chaire de Physique*
Mle	Y. JUND.....	*C.E.S. Microbiologie*
M.	M. LEBOEUF (F.F.).....	*C.E.S. Pharmacotechnie*
Mme	N. LEGER (F.F.).....	*Zoologie*
M.	R. LELUC.....	*Microbiologie (4e A)*
M.	A. LEMONNIER.....	*Chimie analyses (2e et 3e A)*
Mme	S. LEMONTEY.....	*Chimie (4e A).*
Mle	M. LONGEVIALLE (F.F.).....	*Chaire de botanique*
Mle	S. LONGUEVALLE. O .Q	*Chimie examens*
MM.	J. MANDEREAU (F.F).....	*C.E.S. Pharmacotechnie*
	H. MARTIN FRERE (F.F.).....	*Chimie préparations (1re A)*
Mle	H. MORIN. O .Q	*C.E.S. Pharmacodynamie*
M.	H. MOSKOWITZ, (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A N.)*
Mme	M. J. NOTTEGHEN (F.F.).....	*Zoologie*
MM.	NGUYEN PHU LICH.....	*C.E.S. Toxicologie*
	M. PARIS (F.F.).....	*C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Biologie)*
	R. PERLES.....	*C.E.S. Biochimie*
	J. PESTIS (F.F.).....	*Biologie animale (2e A)*
	P. POULLAIN.....	*C.E.S. Hématologie*
	J. RIVET (F.F.).....	*Chaire de Physique*
Mme	M. ROBERT.....	*C.E.S. Sérologie*
Mle	A. ROLLEN. ✻ .O .Q	*Biologie végétale (2e A)*
Mme	N. SALES (F.F.).....	*Biologie animale*
Mle	L. SEGUIN. O . Q (F.F.)	*C.E.S. Analyse appliquée au contrôle des médicaments (physico-chimie)*
Mme	M. SEILLER (F.F.).....	*Pharmacie galénique industrielle*
M.	J. YONGER (F.F.).....	*Chimie analyses (1re A)*

BIBLIOTHEQUE

Mle	Y. RUYSSEN. ✻ . O . Q.....	*Conservateur, chargée de la direction*
Mle	S. LAVAUD. ✻ . O . Q.....	*Conservateur*
Mme	G. KREHMER. O . Q.....	*Conservateur*
Mme	A. DESGRIPPES. O . Q.....	*Bibliothécaire*

A la mémoire de mon Père et de ma Soeur

A ma Mère

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534911_0039

A Mademoiselle S. LAMBIN

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris.

Membre de l'Académie de Pharmacie.

Chevalier de la Légion d'Honneur.

qui nous initia à la bactériologie au cours de nos études et qui nous a fait le grand honneur de présider le jury de cette Thèse.

En témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur A. GERMAN

Professeur de Virologie et d'Immunologie à la Faculté de Pharmacie de Paris.

Pharmacien des Hôpitaux.

Membre de l'Académie de Pharmacie.

qui nous a acceuillie avec une grande gentillesse dans son laboratoire et n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés tout au long de ce travail.

En témoignage de notre respectueuse admiration et de notre profonde gratitude.

A Monsieur A. DESVIGNES

Maître de Conférences Agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris.

qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

Avec l'expression de nos sincères remerciements.

Nous remercions Monsieur le Directeur des Recherches et Moyens d'Essais, ainsi que Monsieur le Pharmacien Colonel PRECEPTIS, qui ont suscité l'élaboration de ce travail, pour l'aide qu'ils ont bien voulu nous apporter et les documents qu'ils ont mis à notre disposition.

A Madame J. PANOUSE-PERRIN

Docteur en Pharmacie

Assistante du Laboratoire de Virologie et Immunologie de la Faculté de Pharmacie de Paris.

qui n'a jamais cessé de nous prodiguer ses encouragements et de nous guider avec la plus grande bienveillance au cours de notre travail.

qu'elle soit assurée de notre sincère reconnaissance et de notre profond attachement.

A Madame P. DANSE et à tout le Personnel du Laboratoire de Virologie et Immunologie de la Faculté de Pharmacie de Paris.

pour l'aide amicale qu'ils nous ont apportée et en témoignage de notre très sincère amitié.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

Chapitre I - Les appareils à prélèvements d'air

" II - Caractérisation et dénombrement des bactéries : quelques résultats.

" III - La viabilité des germes envoyés en aérosols.

DEUXIEME PARTIE

Chapitre I - Technique personnelle de prélèvement des bactéries de l'air.

" II - Dénombrement des germes par coloration directe sur membrane filtrante.

" III - Les déshydrogénases.

" IV - Le chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium : ses propriétés chimiques, son emploi en biologie.

" V - Justification de l'emploi de l'acide glutamique et du glucose dans la méthode proposée.

" VI - Etude au biophotomètre du rôle de l'acide glutamique et du glucose sur la croissance des bactéries.

TROISIEME PARTIE

Chapitre I - Application à différents germes de la méthode par microculture sur membranes.

" II - Application de la méthode à l'étude de l'air d'une cuve expérimentale de 10 m3.

" III - Application de la méthode aux bactéries anaérobies.

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

oOo

INTRODUCTION

Les Anciens croyaient, depuis toujours, que le vent apportait quelquefois des maladies aux êtres vivants et aux plantes. Hippocrate rapporte que des hommes avaient été atteints d'épidémie en respirant un air infecté par des "pollutions hostiles à la race humaine" Quant à la Bible, elle nous montre Jérusalem délivrée d'un siège par une épidémie de peste parmi les assiégeants. Cette même maladie acheva la huitième Croisade devant Tunis en décimant les assaillants dont le roi de France Louis IX. D'autres exemples de ces défaites de la force devant la maladie sont fréquents dans l'histoire, et la possibilité de forcer le destin à l'aide de ces armes semblait séduisante. Mais la possibilité d'emprisonner le vent chargé de ces pollutions paraissait peu probable. Il faut donc attendre la découverte du microscope pour entrevoir que cè vent contenait d'infimes particules permettant la reproduction des plantes ainsi que de minuscules organites ou bactéries capables d'avoir un rôle pathogène pour les êtres vivants.

En 1849, William FARR, (44) à Londres, avait étudié la distribution des cas de choléra lors de la grande épidémie et montré que le plus grand nombre de cas se trouvaient au bord de la Tamise et qu'il diminuait avec l'éloignement en altitude à partir de ce niveau. Il accusait le brouillard du fleuve de transporter les "miasmes" de la maladie.

Il fallut les expériences de Pasteur (112) au XIXe siècle pour détruire le mythe de la "génération spontanée", car on admettait jusqu'alors que la matière inerte pouvait donner naissance à des animaux d'ordre inférieur malgré les travaux de Francesco Redi et de l'abbé Spallanzani.

Pasteur stérilisa des flacons contenant un milieu nutritif et remarqua qu'ils restaient exempts de germes aussi longtemps qu'ils n'étaient pas en contact avec l'air : cette opération avait

donc détruit quelque chose. Lorsque ces mêmes flacons avaient été ouverts, il en restait toujours un ou deux qui demeuraient stériles ; l'air devait donc contenir plus ou moins de microorganismes selon l'endroit où les flacons avaient été débouchés. C'est ce qu'il démontra en 1860 en déposant sur le bureau de l'Académie des Sciences, 73 flacons qu'il avait débouchés à différents endroits et à différentes altitudes. Les résultats suivants furent obtenus :

Altitude	Lieu de prélèvement	Résultats	
		Contaminés	Stériles
300 m	campagne loin de toute habitation sur le premier plateau du Jura.	8	12
850 m.	Monts du Jura	5	15
2000 m.	Montenvers, près de la Mer de Glace.	1	19

Mais, malgré ces expériences, les controverses sur la génération spontanée continuèrent et Pasteur dut extraire les poussières de l'air en les faisant passer dans un coton, dissous ensuite dans l'alcool-éther, pour faire remarquer que les particules observées ressemblaient beaucoup aux "germes" des organismes inférieurs déjà mis en évidence.

C'est à partir de cette époque que de nombreux chercheurs étudièrent systématiquement tous les microbes de l'air pour y trouver les causes inconnues des maladies infectieuses. Cette quête fut longue et souvent infructueuse car la plupart des épidémies se propageaient par d'autres voies que par l'air ; mais pendant les trente dernières années du dix-neuvième siècle, "l'âge d'or de la bactériologie", "la cause" de nombreuses maladies infectieuses iut découverte.

C'est alors que quelques hygiènistes s'efforcèrent de voir si le nombre et le type des microbes présents dans l'atmosphère étaient en rapport avec l'apparition de diverses épidémies. On trouve ainsi les travaux de SALISBURY (1866) (133) dans les vallées de l'Ohio et du Mississipi sur le paludisme, ceux de MADDOX (1870-1871) (83) dont l'appareil de prélèvement, l'aéroniscope, fut repris en particulier par CUNNINGHAM (1873) (32) à Calcutta sur le choléra et surtout ceux de MIQUEL (95), commencés en 1875 par SCHOENHAUER à l'Observatoire du Parc Montsouris, qu'il poursuivit pendant près d'un quart de siècle. Ses premiers travaux con-

sistèrent à examiner au microscope les dépôts obtenus en 24-48 h. sur une surface de verre glycérinée, par un volume d'air mesuré (20 l/h). Puis, la numération microscopique s'avérant souvent difficile, il dut avoir recours à la culture des germes. Il fit alors passer des volumes d'air connus à travers des milieux liquides tels que des bouillons à l'extrait de viande. Il fut ainsi le premier à réaliser une étude à long terme du contenu microbiologique de l'atmosphère par les méthodes volumétriques. Après lui, HESSE (63), en Allemagne, reprit ces études systématiques mais en employant des milieux solides. Enfin au début du XXe siècle, on retrouve encore les travaux du Japonais SAITO (132), mais orientés plus spécialement sur les spores de champignons, et des Canadiens BULLER et LOWE (22) sur les microorganismes de l'air des prairies aux environs de Winnipeg.

Grâce à toutes ces recherches, on était parvenu à donner un sens à la vieille croyance des Anciens et on pouvait affirmer que le vent était capable d'apporter des maladies aux êtres vivants et aux plantes en transportant des germes et des spores que les progrès de la science étaient parvenus à mettre en évidence.

Mais la flore microbienne de l'air est constituée surtout par une flore saprophyte de base comprenant des germes très résistants souvent sporulés :

- des genres Bacillus (subtilis, cereus, megatherium, mesentericus, aerosporus),
- des genres Micrococcus, Sarcina,
- de nombreuses moisissures, des levures et de quelques bactéries anaérobies telluriques,

par une flore accidentelle saprophyte mais surtout pathogène. Toutes les bactéries peuvent y être retrouvées mais plus spécialement celles qui proviennent de l'homme :

- soit de ses voies respiratoires : staphylocoques, streptocoques, pneumocoques, meningocoques, pneumobacilles, bacilles diphtériques, bacilles de la coqueluche, les virus de la grippe, des oreillons, de la rougeole, des adenovirus et, dans certains cas particuliers : Pasteurella pestis, Pasteurella tularensis, virus de la variole dans les croûtes séchées des varioleux, Mycobacterium tuberculosis ;

- soit des germes intestinaux : Entérobactériacées : E. coli, Salmonellae, Streptococcus foecalis, Welchia perfringens.

Cependant, malgré cette longue énumération de germes pathogènes, cette flore accidentelle est moins dangereuse que l'on pourrait le penser car la grande majorité de ces virus et de ces

bactéries succombent très rapidement dans le milieu extérieur : seuls sont assez résistants les staphylocoques, streptocoques, bacilles diphtériques et tuberculeux, les virus de la grippe et de la variole ; il faut aussi une grande concentration d'individus porteurs de germes pour que les microbes répandus puissent se propager par les poussières et les gouttelettes en quantité suffisante pour obtenir une épidémie ou tout au moins un foyer d'infection. Cependant, un apport microbien volontaire peut modifier cette situation assez sensiblement.

Dans un article sur la guerre microbiologique paru en 1958, le Pharmacien Capitaine PARADO (110) écrivait : "Tant qu'on ne dispose pas de méthodes satisfaisantes physiques ou biologiques pour l'analyse d'échantillons, l'homme lui-même constitue le meilleur détecteur des agents utilisés. L'apparition d'une maladie inhabituelle ou d'une épidémie peut être le premier signe d'une attaque biologique".

C'est pourquoi le Comité d'Action Scientifique de Défense Nationale, puis la Direction des Recherches et Moyens d'Essais, nous ont demandé d'essayer de mettre au point une méthode de détection rapide des germes envoyés dans l'air en cas d'une éventuelle agression bactériologique.

La première partie de ce travail est consacrée à l'étude des différents facteurs qui interviennent dans la méthode que nous allons préconiser : après un aperçu des différentes méthodes de prélèvement employées à ce jour, avec l'indication de leurs efficacités respectives, nous examinerons la question de la quantité de bactéries habituellement présente dans une atmosphère déterminée : hopital, lieu public, habitation, jardin, etc..., ainsi que la viabilité des germes envoyés en aérosols.

Dans une seconde partie, nous présenterons la méthode que nous avons adoptée en la comparant à celles présentées ci-dessus au point de vue du prélèvement et des résultats. Nous expliquerons ensuite la partie originale de cette méthode qui s'appuie sur une réaction biochimique des germes, et nous serons ainsi amenée à rappeler quelques notions sur les déshydrogénases bactériennes. Nous étudierons l'indicateur de réduction employé, le chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium tant du point de vue chimique que de son emploi en biochimie ou en bactériologie. Nous expliquerons ensuite par quel procédé nous avons réussi, en employant l'acide glutamique et le glucose, à accélérer la réponse de la méthode. Enfin, nous étudierons, à l'aide du biophotomètre enregistreur, l'accélération de la croissance des germes obtenus par la méthode préconisée.

Dans une troisième partie, nous généraliserons le procédé en l'appliquant systématiquement à différents germes aérobies ; puis nous étudierons le cas des bactéries anaérobies en essayant d'adapter la méthode à leur culture.

oOo

PREMIERE PARTIE

ooOoo

CHAPITRE I

LES APPAREILS A PRELEVEMENTS D'AIR.

De très nombreuses méthodes ont été proposées, chacune s'efforçant de trouver le perfectionnement permettant de capturer tous les germes présents dans l'air.

LUCKIESH, TAYLOR et HOLLADAY (82) ont défini les principales caractéristiques qu'il faut attendre d'un collecteur à bactéries de l'air, cependant la méthode idéale est encore loin d'exister.

Il y a lieu de distinguer sept grands groupes parmi ces techniques :

- la sédimentation
- la filtration
- la centrifugation
- le choc en milieu liquide (impigement)
- le choc en milieu solide (impaction)
- la précipitation électrostatique
- la précipitation thermique.

1° - La sédimentation

Elle a pour but de laisser déposer les particules en suspension dans l'air sur des milieux solides que l'on porte ensuite à l'étuve : les bactéries se développent et peuvent être identifiées par les méthodes habituelles au bout de 48 heures. C'est la plus ancienne méthode employée dès la première moitié du XIXe siècle : on exposait au contact de l'atmosphère des plaques de verre enduites d'huile ou de glycérine (MIQUEL). (96).

Malheureusement, cette technique très simple est soumise aux caprices du vent et des courants d'air. Par rapport au temps de prélèvement, les résultats obtenus sont toujours inférieurs à ceux obtenus par les autres méthodes ; les grosses particules inertes se déposant plus facilement que les petites qui contiennent le plus souvent les bactéries, il n'est possible de l'utiliser que comme méthode de comparaison.

2° - La centrifugation.

Elle a pour but d'accélérer la vitesse des particules grâce à la force centrifuge. L'accélération, étant proportionnelle à la masse, va augmenter surtout la vitesse des grosses particules qui se déposeront les premières.

Dans la "centrifugeuse de Wells", le milieu collecteur, liquide ou gélosé, couvre, grâce à la force centrifuge, la paroi intérieure d'un cylindre de verre vertical tournant à la vitesse de 3 500 à 4 000 tours par minute. Le débit de l'appareil est d'environ 30 à 50 litres d'air par minute, qui sont aspirés à travers le cylindre et lancent leurs particules sur les parois intérieures de ce cylindre où elles sont recueillies. Le dépôt des particules approche 100 pour cent lorsqu'elles mesurent 2 à 3 μ , il n'est plus que de 50 pour cent, pour celles de 0,77 μ . (PHELPS et BUCHBINDER) (119).

3° - La filtration.

Elle consiste à faire passer un volume déterminé (ou non) d'air à travers diverses matières capables de retenir les particules en suspension et, parmi elles, les bactéries.

PASTEUR (1860) employait des bourres de coton solubles placées dans un tube au travers duquel il faisait passer un volume connu d'air. Il les dissolvait ensuite dans de l'alcool-éther et, après évaporation du solvant, examinait directement les bactéries au microscope. MIQUEL, en 1888, passa en revue les différents procédés employés jusqu'à ce jour et, en particulier, les méthodes de filtration sur laine de verre (FRANKLAND) (47), sur silicates insolubles (PETRI) que l'on dilacère dans de l'eau stérile, ainsi que les filtres solubles : sulfate de sodium desséché, sel marin anhydre stérilisé à + 200° C, silicates solubles, laine de sucre (PASTEUR). Plus récemment, RICHARDS (1955) (127) emploie la laine soluble à l'alginate de sodium et HAMMOND (59) la laine à l'alginate d'ammonium.

Ces travaux ont été repris par les auteurs russes : VERCHIGORA (151) utilise la poudre d'alginate de sodium stérilisée 1 à 2 h. à 160° C à la chaleur sèche et placée dans une allonge spéciale de verre construite par l'auteur ; après prélèvement, la poudre est dissoute dans 15 ml d'eau stérile et cette solution sert à ensemencer les différents milieux ; mais si cette méthode est satisfaisante pour les bactéries, GRIGOR'EVA (57) a montré en 1963 que l'alginate de sodium ne retient pas complètement un aérosol de bactériophages qu'on retrouve sur un filtre témoin de contrôle en tissu, et qu'en outre il présente un effet inactivant sur le phage.

Les filtres solubles en mousse de gélatine, suivant la technique de MITCHELL (98) ont été repris en U. R. S. S. par RECHMENSKII et MITCHENKO (125). Ces filtres sont pesés avant et après passage de l'aérosol pour connaître le poids des gouttelettes d'aérosol absorbées, puis ils sont dissous dans une solution tampon phosphatée à pH = 7,14. On les emploie principalement pour les aérosols de virus.

SINEL'NIKOVA (143) a pensé pouvoir utiliser les mousses liquides pour la détection des aérosols bactériens en modifiant la technique de REMY (124) qui consiste à adsorber des aérosols chimiques à travers des filtres de verre poreux placés dans un cylindre avec de l'eau : il se forme des mousses liquides dont l'efficacité augmente si le rayon des bulles d'air diminue : il y a donc formation d'une couche d'adsorption à l'interface solution-gaz.

SINEL'NIKOVA a remplacé le cylindre et l'eau par des entonnoirs avec filtres en verre poreux. Le bouillon de viande peptoné, ou la solution de glycérine à 30 pour cent dans ce bouillon, sous un volume de 0,5 à 0,75 ml, donnent par le passage de l'air étudié une mousse excellente, mais se détruisant vite, qui retient les microorganismes. GROSCLAUDE et HERMIER (58) ont mis au point à la Station Central de Microbiologie et Recherches Laitières de Jouy-en-Josas une méthode inspirée de la technique de PETRI (118). Celle-ci consistait à faire passer l'air à travers un tube rempli de sable qui pouvait ensuite, après mélange avec de la gélose, être versé dans des boites de Pétri. Ils font passer l'air à travers une couche de très petites billes de verre arrêtant les microorganismes ; ceux-ci sont ensuite remis en suspension par agitation des billes dans un milieu liquide convenable. Ils démontrent que les bactéries ne demeurent pas sur les billes mais sont bien recueillies en totalité dans la solution.

Les membranes filtrantes, appelées alors filtres moléculaires, ont apparu avec les travaux de SANARELLI (134) en 1891, sous la forme de membranes de collodion imperméables aux bactéries mais perméables à leurs toxines. Pendant la guerre de 1914-1918, SZIGMONDY et BACHMANN (169) mirent au point leur fabrication qui fut commercialisée par la "Membranfilter Gesellschaft" à Göttingen en Allemagne. Ensuite, on les oublia quelque peu ; seuls, ELFORD (41) en Angleterre et GRABAR (54) en France, améliorèrent la régularité de leurs pores.

Pendant la deuxième guerre mondiale, SZIGMONDY, alors directeur de l'industrie des colloïdes à Göttingen, fit étudier la fabrication industrielle des membranes : les Allemands avaient été impressionnés par l'application des membranes filtrantes par les Russes dans le service de surveillance des eaux de Kiev qu'ils découvrirent lorsqu'ils s'emparèrent de cette ville en 1942. Après la guerre, GOETZ (51), venu à Göttingen étudier la fabrication des membranes, en rapporta le principe aux U. S. A.

Il y a plusieurs qualités de membranes filtrantes, suivant leur origine allemande, anglaise ou américaine : les différences portent surtout sur la nature des pores ; ceux-ci peuvent être tortueux comme sur les membranes Gelman qui ont une structure semblable à une éponge. Toutes les autres ont des canaux rectilignes mais, seules, les membranes Millipore peuvent garantir un diamètre de pores identique sur toute la surface de la membrane.
La plus utilisée actuellement en bactériologie est la membrane Millipore. Elle est faite d'esters de cellulose très purs et contient des millions de pores capillaires de même diamètre et rectilignes (on trouve dix porosités différentes allant de dix millimicrons à cinq microns). On les emploie dans des appareils à filtration spéciaux où la membrane est montée sur des plaques en verre poreux, ou en charbon. L'air est entraîné sur les membranes par une trompe à vide reliée à la fiole de Kitasato sur laquelle est placé le dispositif de filtration et toutes les particules sont arrêtées si leur diamètre est supérieur à la taille des pores. Le type HA avec des pores de 0,45 μ arrête les bactéries mais son débit n'est que de 9,6 l/mn.
Après le prélèvement, on dépose la membrane sur un milieu nutritif solide ou sur un tampon imbibé de milieu liquide et on porte à l'étuve ; après 24 à 48 h., on peut dénombrer les colonies qui se sont développées. Mais cette méthode excellente dans le cas de l'analyse de l'eau, présente des inconvénients dans le cas de l'air, car il y a dessiccation par passage prolongé de l'air et la viabilité des bactéries recueillies est diminuée.

Dès 1932, RAZUMOV (123) filtrait des prélèvements d'air directement sur membrane filtrante, travail repris par VLODAVETS (153) en 1963 (mais en mettant les bactéries en suspension dans du sérum physiologique ou du bouillon sucré).

4° - Le barbotage

C'est une méthode retenant les particules en suspension dans l'air par barbotage dans un liquide. Les techniques fondées sur ce principe sont d'autant meilleures que le passage de l'air forme des bulles plus fines. L'appareil de WHEELER, FOLEY et JONES (163) (modification de l'appareil de ROBERTSON, BIGG, MILLER et BAKER (129) est constitué par une fiole de Kitasato où pénètrent deux tubes de verre de 12,5 mm de diamètre, l'un court conduisant au manomètre, l'autre long terminé par un renflement percé de trous de 2 mm de diamètre par lequel pénètre l'air aspiré par une pompe. La fiole contient 50 ml de bouillon et 295 g. de billes de verre qui ont pour but de briser les bulles d'air et de laisser ainsi échapper les bactéries dans le bouillon. Les meilleurs résultats sont obtenus avec un débit d'air variant de 3,6 à 9 l/mn. Si on monte cet appareil en parallèle avec la centrifugueuse de Wells, on obtient huit fois plus de germes.

Sur ce même principe, MOULTON, PUCK et LEMON (101) ont imaginé un appareil qui combine le barbotage et la mise en aérosol pour enrober les particules d'une couche de liquide. L'air pénètre dans la première partie de l'appareil, traverse un capillaire en connection avec le liquide collecteur qui est ainsi aspiré dans ce capillaire d'où il est transformé en aérosol dans le courant d'air : ou bien les gouttelettes retombent, ou bien elles arrivent dans la deuxième chambre où l'air pénètre en barbotant à travers les cinq trous d'un millimètre de diamètre du tube abducteur. On fait des prélèvements de 10 à 15 minutes à 20 l/mn. Il faut cependant tenir compte de l'évaporation du liquide et faire les corrections nécessaires.

5° - Les méthodes par choc.

Les méthodes par barbotage ont été perfectionnées et elles ont donné naissance aux méthodes par choc : on fait arriver le jet d'air à grande vitesse sur une surface résistante : les grosses particules se désagrègent et sont recueillies soit en milieu liquide, soit en milieu solide. Les méthodes en milieu liquide sont désignées dans la littérature anglaise sous le nom d'"impinger", celles en milieu solide sous celui d'"impactor".

a) Choc sur milieu solide.

Dans un article publié en 1953 à Moscou, KROTOV (73) cite un collecteur de bactéries de l'air construit dès 1885 par PAVLOSKIY (113) qui aurait utilisé l'action du choc d'un jet d'air sur la surface d'un milieu nutritif. Ensuite, il décrit son propre appareil : à l'aide d'un ventilateur centrifuge, l'air est aspiré à l'intérieur d'un cylindre à travers une fente cunéiforme située au-dessus d'une boite de Pétri contenant un milieu nutritif. La boite repose sur un support tournant à un tour par seconde, ce qui permet une répartition uniforme des particules contenues dans l'air. En dehors de ces travaux, l'appareil-type de cette catégorie est celui de BOURDILLON et Coll. (15, 16), appelé collecteur à fente (Slit Sampler) : une fente de 0,33 mm de large sur 27,5 mm de long, placée à la partie supérieure d'une chambre, laisse passer un courant d'air qui frappe une gélose nutritive placée dans une boite de Pétri animée d'un lent mouvement de rotation. Après quelques minutes, la boite est retirée, fermée et placée à l'étuve. On peut régler la distance qui sépare le milieu de la fente ainsi que la vitesse de rotation ; connaissant le nombre de colonies qui se sont développées, le débit de l'air et le temps de prélèvement, il est facile de calculer le nombre de bactéries par m3.

Ce procédé a surtout été employé pour les essais effectués à l'intérieur car la quantité d'air analysé est faible. C'est pourquoi ANDERSEN (3) en 1961 a utilisé le même principe mais avec une

capacité d'échantillonnage beaucoup plus importante en imaginant le "Monitor" : un tambour recouvert de gélose, tourne grâce à un mouvement d'horlogerie monté sur le couvercle et descend de 3 mm à chaque tour. Le jet d'air qui arrive par un ajutage latéral de diamètre variable, frappe le tambour suivant une ligne qui recueille les bactéries et se répète 28 fois, soit une longueur totale de 12,29 mètres. La vitesse du tambour est réglable, ce qui donne des périodes de prélèvements variant de 28 minutes à 28 heures, celle du jet d'air également (on utilise couramment des débits de 0,5 à 3 litres).

LUCKIESH, TAYLOR et HOLLADAY (82), en 1946, décrivent un appareil différant très peu du précédent qu'ils appellent collecteur à jet latéral (radial jet sampler) : l'air pénètre dans un tambour de métal fermé, passe à travers une fente latérale située au fond et tombe à grande vitesse sur la boite de Pétri. Les grosses particules peuvent se désagréger avant d'arriver sur le milieu nutritif en frappant la paroi du tambour de métal. Cet appareil a un débit de 28,3 l/m. et la vitesse de l'air peut atteindre 30 m/s. La boite de Pétri tourne à raison de deux tours par minute. On peut obtenir des résultats excellents allant jusqu'à 95 pour cent mais l'appareil est peu maniable car il est très lourd à cause de la pompe.

L'appareil à chocs en cascade (Cascade Impactor) de K. R. MAY. (88, 89) L'air aspiré passe à travers un tube coudé contenant successivement quatre orifices de diamètre décroissant derrière lesquels les particules sont arrêtées par des plaques de verre recouvertes d'une matière adhésive. On observe que la vitesse de passage de l'air augmente au fur et à mesure que le diamètre de l'orifice décroît, les grosses particules se déposant les premières, les plus petites ensuite. Le modèle original, pour un débit d'air de 17,5 l/m, permettait d'obtenir les vitesses suivantes : 2,2, 10,2, 20,4 et 34 m/s et le dépôt de 50 pour cent des particules, dont les diamètres étaient respectivement de 12 μ, 4 μ, 2 μ, 1 μ. Par la suite, on a obtenu des rétentions jusqu'à 0,5 μ.

C'est un appareil idéal pour les essais très courts, mais après une ou deux heures, il y a colmatage. D'autre part, il faut ensuite récupérer les bactéries sur les lames de verre. C'est pourquoi ANDERSEN (2) (1958) a mis au point un appareil combinant le prélèvement en cascade et la récolte sur boite de Pétri. Le collecteur d'ANDERSEN est formé par une série de 6 étages superposés, chacun consistant en un tamis percé de 400 trous, situé juste au-dessus d'une boite de Pétri contenant un milieu de culture. Le nombre des mailles de chaque tamis est toujours le même, mais leur diamètre va en diminuant de 1,8 mm à 0,25 mm ce qui a pour effet d'accélérer le jet d'air de 1 m/s à 23 m/s. Après l'expérience, on retire les boites de Pétri de l'appareil et on les place à l'étuve.

b) Choc en milieu liquide.

Les collecteurs en milieu liquide doivent leur origine au piège à poussières de GREENBURG-SMITH mis au point en 1922 (55). Mais ce n'est qu'en 1942, avec l'échantillonneur de PORTON, que sont apparus les différents modèles ; leur principe est toujours identique : l'air est aspiré à travers un tube terminé par un capillaire et rencontre à sa sortie un liquide sur lequel les particules qu'il contient s'écrasent à grande vitesse avec formation de minuscules bulles. En même temps, le capillaire sert à rendre le débit de l'air indépendant de la pression extérieure. On trouve alors trois types (150) :

- le collecteur ordinaire (standard impinger) dérivé directement de celui de PORTON,
- le collecteur tout en verre (all-glass impinger), qui est un "PORTON" amélioré, mais qui en a tous les avantages et tous les inconvénients,
- le collecteur capillaire (capillary impinger) ou appareil de ROSEBURY-HENDERSON (61) : c'est un flacon long et étroit surmonté par un bouchon avec deux tubulures : l'une pour l'aspiration, l'autre pour l'arrivée de l'air ; ce dernier tube est terminé par un court capillaire qui s'enfonce au moins de 5 mm en dessous du niveau du liquide mais reste à 4 mm du fond du flacon. Le diamètre du capillaire commande le débit de l'air de 2 à 20 l/mn. Le flacon contient environ 20 ml de liquide collecteur. Si on utilise cet appareil pour analyser des atmosphères contenant de grosses particules, la partie coudée du tube abducteur peut les arrêter si leur diamètre dépasse 8 μ . On a alors intérêt à adopter à l'appareil un pré-collecteur qui est un récipient sphérique percé d'un trou et relié au tube abducteur (90). Cet appareil arrête les grosses particules soit telles quelles, soit dans un liquide collecteur qui permet de les retrouver.

On trouve encore :

- le "midget impinger" employé pour les débits très lents,
- le "bulged AGI", un collecteur tout en verre dans lequel le tube capillaire est remplacé par un renflement percé de trous ; l'air frappe la paroi tangentiellement et est renvoyé dans le liquide, ce qui dissocie les particules,
- le "venturi scrubber" (84). L'appareil consiste en un collecteur où débouche latéralement un ensemble formé de deux entonnoirs superposés ou gorge de Venturi ; la partie par laquelle pénètre l'air a un diamètre de 6 cm qui se resserre jusqu'à 1,5 cm ; à cet endroit, l'air atteint une vitesse de 75 à 90 m/s . On couple avec une circulation du liquide du collecteur qui, sous l'action de la pression au niveau de la gorge, donne un aérosol de gouttelettes. Cet appareil est surtout employé pour déterminer la pollution de l'air des villes, car il retient de grands volumes dans un temps relativement court.

COWN, KETHLEY et FINCHER (31) décrivent un appareil, piège liquide à orifice critique (critical orifice liquid impinger) ; c'est un récipient en forme de bouteille à lait contenant 200 ml de liquide collecteur dans lequel plonge un tube abducteur terminé par un orifice dont les dimensions doivent donner la pression critique, c'est-à-dire le rapport entre les pressions ascendante et descendante permettant d'obtenir un choc égal à celui de la vitesse du son. Pour l'air, la pression critique est 0,53 et si la pression ascendante ou atmosphérique est de 760 mm Hg, la pression descendante ne doit pas dépasser 402 mm Hg.
Le diamètre "d" du tube est donné par la formule $Q = 9 \times d^2$, Q étant le volume d'air en l/mn. Ainsi, un orifice de 0,33 mm doit donner 1 l/mn à la vitesse du son. La fabrication du tube abducteur doit être très soignée ; on doit vérifier le débit et rejeter tous les tubes qui dépassent celui-ci de plus ou moins 20 pour cent. Cet appareil donne d'excellents résultats à condition que l'extrêmité du tube soit au moins à 2 cm du fond du flacon, sinon le nombre de bactéries récoltées diminue. (ROSEBURY) (131). Par contre, la température du liquide collecteur est sans effet jusqu'à 20°, mais les résultats sont moins bons à partir de 32°. En 1959, après avoir passé en revue les différents collecteurs en milieu liquide, SHIPE et ses Coll. (142) ont mis au point l'échantillonneur de SHIPE en tenant compte des diverses remarques qu'ils avaient faites. C'est une fiole d'Erlenmayer de 125 ml avec une ouverture latérale pour la pompe. Le bouchon est traversé par un tube en métal dont l'extrémité très rétrécie remplace le capillaire. L'appareil contient 25 ml de solution gélatinée de phosphate + 0,02 ml d'huile d'olive comme anti-moussant ; mais le débit étant trop violent, ils ont dû modifier l'appareil en faisant pénétrer l'air tangentiellement à l'ouverture et au fond de la fiole en faisant une ouverture sur le côté du tube métallique : le débit y est encore de 8,5 l/mn ; enfin ils ont proposé un "collecteur modifié", en adaptant au tube ce qui était un "échantillonneur tout en verre". Les seules difficultés étaient dues à la stérilisation de l'ensemble et à la fixation du métal au verre de façon satisfaisante. Actuellement, le métal a été remplacé par du nylon.

GAIDAMOVITCH, VLODAVETS et OBURKHOVA (49) ont décrit l'appareil de D'yakonov qui combine le choc en milieu liquide avec le barbotage. Il consiste en un cylindre de verre fermé par un bouchon traversé par 2 tubes de même diamètre. L'air pénètre par le tube le plus long au fond du récipient. Le pouvoir de capture optimal est déterminé par le rapport entre le diamètre du tube et la hauteur de la quantité de liquide, compte tenu des billes de verre. Pour augmenter le contact entre l'air et le liquide, à l'extrémité inférieure du tube long, on trouve soit un orifice capillaire, soit une plaque de verre percée de trous (MILYVSKAY (93)) d'où l'air s'échappe en frappant violemment le fond du flacon, ce qui peut réduire la vitalité des bactéries (91). Cet appareil de 23 cm de haut et de 21 mm de diamètre peut aussi servir à retenir un aérosol de virus grippal.

6° - La précipitation électrostatique.

Le déplacement dans un champ électrique des particules chargées est largement employé dans l'industrie pour extraire la poussière dans l'air. En 1941, BERRY (7) a appliqué ce principe à l'analyse bactériologique de l'air. Les particules sont soumises à deux effets :

- choc en milieu solide (impingement) résultant du changement latéral de direction du courant d'air dans l'appareil ;
- entrainement vers la gélose avec le courant d'air électrifié.

Selon GIBBS (50), les ions formés par l'ionisation se déplacent à grande vitesse vers la surface opposée chargée et le courant entraîne les plaques sur cette surface.

Il construisit un appareil sur le principe d'HOLLAENDER et DELLA VALLE (64). Ce principe est repris en 1946 par LUCKIESH et Coll. (81), au lieu de l'appareil initial qui comportait un entonnoir renversé sur une boite de Pétri de diamètre légèrement supérieur à laquelle on adaptait une chambre à haut voltage (7000 à 8000 volts) ; ayant vérifié que les bactéries peuvent être chargées positivement, négativement ou pas du tout, ils imaginent un appareil comportant deux boites de Pétri contenant un milieu gélosé posé sur deux pièces métalliques formant électrodes chargées chacune à 7 000 volts mais de signe contraire. Chaque boite est surmontée d'un cône renversé par lequel pénètre l'air aspiré à la vitesse de 14 l/mn. L'ensemble se trouve contenu dans une valise avec redresseur de courant et ne pèse pas plus de 6 kg, ce qui permet de l'utiliser partout car le transport en est très facile : c'est le double collecteur de la General Electric. On peut aussi faire arriver l'air latéralement à la vitesse de 5 à 35 l/mn dans l'échantillonneur à jet radial.

GREGORY (56) a montré que dans le cas d'un aérosol de E. coli, l'électrode positive récolte près de 10 fois plus de germes que l'électrode négative. Par contre, avec des bactéries naturellement dans l'air, l'électrode négative reçoit 30 pour cent de plus de bactéries. Il faut penser que chaque boite recueille les particules neutres par choc de façon égale, mais comme celui-ci n'est pas très violent, les agrégats ne sont pas dissociés.

L'électroprécipitateur de VERCHIGORA (151) crée un champ élevé de 12 000 volts dans une chambre de précipitation et d'ionisation. La précipitation de l'aérosol en gouttelettes se produit directement à la surface des milieux nutritifs dans la boite d'aluminium de l'électrode de précipitation. Cet appareil permet de déterminer 99 pour cent des corpuscules de l'aérosol en gouttelettes.

L'hydroaéroscope de MAISONNET (85) est un appareil qui associe diverses méthodes de prélèvement : le criblage des particules, la précipitation électrostatique et le piègeage en liquide. Il consiste en une armature laissant à sa partie supérieure une ouverture formée par un crible à 200 trous de 0,8 mm de diamètre qui dissocie les particules et assure leur répartition régulière sur une boite de Pétri contenant un milieu convenable. Cette boite fait partie d'un plateau-électrode dont le potentiel est zéro ; juste en-dessous se trouve un deuxième plateau dont le potentiel est très élevé et qui est précédé d'un deuxième crible à 300 trous et d'une boite de Pétri. Selon leurs charges, les particules sont précipitées sur l'un ou l'autre des ensembles, ensuite les germes non chargés restants sont captés par piègeage de l'air dans un long tube de 3 mm de diamètre dont l'extrémité capillaire de 1,2 mm plonge dans un liquide collecteur. La vitesse d'aspiration est de 3 à 9 l/mn. Mais cet appareil est resté au stade du laboratoire.

En 1960, O'CONNEL, WIGGINS et PIKE (107), ont proposé un appareil électrostatique très simple : une baguette en matière plastique de 5 cm de long, bien sèche et stérile, tenue par une pince en bois, est chargée électrostatiquement par frottement 5 ou 6 fois sur un morceau de tissu ; elle est ensuite suspendue dans l'air quelques secondes, puis roulée sur la surface d'une gélose nutritive. On peut aussi agiter la baguette dans un milieu liquide nutritif et ensemencer à partir de cette suspension. De bons résultats sont obtenus pour un degré d'humidité de 15 à 95 pour cent. Cette méthode permet un contrôle rapide et simple des atmosphères stériles.

7° - On peut rattacher à ces méthodes la précipitation thermique.

En 1952, KETHLEY, GORDON et ORR (69) décrivent un précipiteur thermique pour l'aérobactériologie. L'air pénètre au centre, sur le dessus de l'appareil, par un gros tube et s'échappe par un orifice latéral petit. Sous l'appareil, se trouve une chambre refroidie par un courant d'eau. N'importe quelle particule présente dans l'air et passant dans le champ thermique va vers l'une ou l'autre surface, celle d'entrée étant chauffée. Mais le débit de cet appareil est très faible.

En 1956, ORR, GORDON et KORDECKI (109) ont modifié l'appareil en ajoutant un substrat ; du papier filtre ordinaire Whatman n° 1 saturé de solution nutritive. La surface chaude à + 125° C est distante de 0,40 mm de la surface froide à + 25° C. Le temps de prélèvement doit être de 15 secondes à 5 minutes au maximum ; si ce délai est dépassé, l'air devient trop sec et le papier sèche. L'humidité est réglée dans la chambre et vérifiée par une cellule au chlorure de lithium. Le papier filtre est ensuite mis à cultiver sur une boite de Pétri. Cette méthode est rapide, simple et directe ; les colonies sont à la surface du papier et non dans un milieu, les dilutions sont supprimées.

oOo

CHAPITRE II

CARACTERISATION ET DENOMBREMENT DES BACTERIES-

QUELQUES RESULTATS

Les bactéries collectées par les diverses méthodes de prélèvement doivent ensuite être mises à cultiver, car l'examen direct du liquide collecteur, comme le faisait PASTEUR, au microscope entre lame et lamelle, n'est possible que si l'échantillon considéré contient un très grand nombre de germes.

MIQUEL (96) avait déjà essayé diverses méthodes ; tout d'abord, il avait remarqué que l'emploi des plaques de gélatine était peu précis car les moisissures de l'air les liquéfiaient plus ou moins : à l'Observatoire de Montsouris, où le chiffre des moisissures dépasse celui des bactéries, l'eau des ballons-collecteurs distribuée dans 25 plaques de gélatine entraîne si souvent la liquéfaction que toute numération sérieuse est impossible. Par contre, au centre de Paris où les muscédinées sont en nombre dix fois plus faible, les résultats sont bien meilleurs.

Il démontra ensuite que les milieux liquides sont plus aptes que les milieux solides au développement de la majeure partie des bactéries de l'air. Même lorsque toutes les conditions sont identiques, la gélose entrave le "rajeunissement des semences aériennes" : un poids d'eau stérilisé contaminé par le courant d'air distribué en parties égales dans du bouillon peptoné et de la gélatine peptonée donne, au bout de 30 jours, sur une moyenne de 300 essais, les résultats suivants :

	Bactéries	Moisissures
Bouillon à + 18° C	100	100
Gélatine à + 18° C	57	69

"La moitié à peu près des bactéries de l'air et le tiers des muscédinées trouvent un tombeau dans les plaques de gelée".

BESSON (9) reprit ces études en effectuant deux fois par jour des filtrations d'air, rue des Blancs-Manteaux à Paris, sur papier filtre amianté (papier Schneider CA 32). L'air est aspiré à raison d'un litre par minute de bas en haut, le papier est ensuite posé sur une gélose ordinaire liquéfiée à + 48°C. Ce filtre retient 99,9 % des particules supérieures à 0,3 µ mais un calcul théorique montre que, seules, les particules de diamètre inférieure à 10 µ se déposent sur le filtre à cause du sens de l'aspiration. D'après les résultats obtenus, il semble que le papier ne retienne que le dixième au plus des germes de l'air.

BESSON établit le tableau n° 1 :

	Miquel Période 1889-1898 Place Saint-Gervais		Sartory Période 1909-1911 Rue de Rivoli	Lab. Hygiène 1955 Rue du Marché des Blancs-Manteaux			
				Mois	Bact.	Moisis.	Total
	Bactéries	Moisissures					
Automne	6.015	2.320	1.540	janv.	17	32	49
Hiver	4.020	1.600	514	fév.	19	28	47
Printemps	9.400	1.965	2.175	mars	23	34	57
Eté	10.845	2.480	1.670	avr.	32	26	58
Moyenne anuelle	7.570	2.090	1.460				

TABLEAU N° 1

Ces valeurs représentent un nombre de germes moyen par m3, mais il importe de noter trois choses :

- la technique de MIQUEL utilise la filtration de l'air sur sulfate de sodium et ensemencement en bouillon.

- le procédé de SARTORY et LANGLOIS (136) comporte la même filtration mais l'ensemencement se fait en milieu solide sur gélose et gélatine ;

- la méthode de BESSON décrite ci-dessus ne récupère que le 1/10e des germes.

Cependant, les auteurs américains préfèrent utiliser des milieux solides, soit que les prélèvements soient faits directement sur eux (méthodes par précipitation électrostatique et précipitation

thermique, par sédimentation, par choc en milieu solide), soit que les germes soient collectés en milieu liquide qui est ensuite ajouté stérilement au milieu liquéfié tiède ou à la surface de ce même milieu. Dans le supplément 27 de l' "American Journal of Public Health" (1), le meilleur préconisé pour l'air est la gélose nutritive. Pour cela : 1 ml de liquide pur ou dilué au 1/10 ou au 1/100e est ajouté à 20 ml de milieu gélosé liquifié et ramené à + 40°C environ. Après refroidissement, la boîte de Pétri est portée à l'étuve et les numérations effectuées après incubation de 48 à 72 h. à + 37°C ou 22°C. Connaissant les dilutions de départ et le nombre de litres d'air analysé, on en déduit le nombre de germes par m3 d'air. S'il s'agit de moisissures, 5 à 6 jours d'étuve à 22° C sont nécessaires. Cependant, il est possible de conserver les prélèvements quelque temps au réfrigérateur si l'ensemencement immédiat n'est pas possible. Si un germe particulier est recherché, on aura intérêt à utiliser un milieu plus sélectif. Pour le Streptocoque β hémolytique de l'air des locaux hospitaliers, YAROCHENKO (167) utilise le milieu de Garrod. Les recherches de BOURDILLON, LIDWELL et THOMAS en 1941 (16) ont montré, en effet, que ce milieu est préférable à la classique gélose au sang car on y décèle davantage de germes ; les streptocoques β hémolytiques s'y développent ainsi que des streptocoques α verdâtres alors que la croissance des saprophytes de l'air est diminuée jusqu'à 95 pour cent, grâce à un inhibiteur, le violet de gentiane. La composition de ce milieu est la suivante : 2 pour cent de gélose dans du bouillon de Heathley auquel on ajoute 10 pour cent de sérum de cheval et 1/500. 000 de violet de gentiane.

RETCHMENSKI et STCHAVELEVA (126) en 1945 ont recommandé son emploi au cours des recherches sur l'air souillé par la flore pyogène. Par la suite, DROZDOVA (36) en 1949 y ajouta 2 ml de benzidine à 0, 5 pour cent pour 100 ml de milieu de Garrod et différencia les streptocoques β hémolytiques qui se développent sous forme de petites colonies incolores qu'entoure la zone d'hémolyse, tandis que les streptocoques α verdâtres et non hémolytiques forment des colonies argentées ou noires.

Dans le cas du Staphylocoque hémolytique, TCHISTOVITCH (147) en 1954 préconisa un milieu gélosé salé au jaune d'oeuf : pour 100 ml de bouillon de viande peptoné gélosé contenant 10 pour cent de ClNa stérile, on ajoute 20 ml de dilution de jaune d'oeuf préparée par agitation aseptique d'un jaune d'oeuf de poule dans 200 ml de sérum physiologique, SAROTCHINSKAYA (135) a employé une gélose au sang + 5 pour cent de ClNa.

YAROCHENKO a effectué des prélèvements d'air simultanément avec l'appareil de KROTOV (73) et celui de RETCHMENSKI (126) en les plaçant au centre des salles d'hôpital à 0, 75 m. et 1, 2 m. du sol et en faisant passer 150 litres dans l'appareil de Krotov et 75 litres dans celui de Retchmenski. Il recueillit ensuite tout le liquide

collecté et le plaça sur des boîtes de Pétri contenant les milieux ci-dessus. Tous les ensemencements sont portés à l'étuve à 37°C durant 24 à 48 h., puis les boîtes sont placées à la température ambiante durant 2 à 3 jours ; les colonies typiques sont alors dénombrées.

TORLONI et BORZANI (149) ont utilisé un système de filtration comprenant un filtre en papier Whatman n° 42 posé sur une épaisseur de coton qui repose elle-même sur un support de filtration ; après passage de l'air, ils ajoutent 10 ml de milieu de culture liquide à l'ensemble : la majorité du liquide est retenue par le coton, ce qui est suffisant pour assurer le développement des microorganismes retenus à la surface du papier filtre. Ces auteurs emploient pour Saccharomyces cerevisiae et Rhodotorula species le milieu suivant :

Extrait de viande	3 g
Peptone	5 g
Glucose	10 g
Eau distillée q. s. p.	1000 ml

et pour Staphylococcus pyogenes aureus :

Extrait de levure	25 g
Peptone trypsique	10 g
Gélatine	15 g
d-mannitol	55 g
Chlorure de sodium	75 g
Sulfate d'ammonium	5 g
Phosphate monoacide de potassium	15 g
Eau distillée q. s. p.	1000 ml

Les systèmes de filtration sont mis à incuber dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau à 28° ou 30°C pendant 48 à 72 h. et les colonies sont alors comptées.

Une autre possibilité est offerte avec les membranes filtrantes : la filtration du liquide collecteur est effectuée à travers une de ces membranes, et celle-ci est déposée sur un milieu de culture où les colonies sont comptées directement après 24 à 48 h, ou même colorées pour obtenir une meilleure différenciation des petites colonies.

a) Culture.

Après filtration, la membrane Millipore est retirée aseptiquement de l'ensemble filtrant et transportée sur une boîte de Pétri contenant un milieu convenable, le côté du filtre portant les microorganismes étant à la partie supérieure. Tous les milieux solides utilisés en pratique bactériologique peuvent être employés. Cependant, il est parfois plus commode d'utiliser des milieux liquides. Dans ce cas, la membrane est placée sur un tampon auquel on a fait

absorber un liquide nutritif. Les fabricants des filtres Millipore en conseillent plusieurs parmi lesquels nous relevons : le bouillon de coeur et de cerveau pour les numérations totales, le bouillon Endo (Difco) pour l'analyse de l'eau, un milieu pour levures et moisissures, le milieu 110 pour le Staphylocoque. Pour les laboratoires pressés ou occasionnels, tous les milieux ci-dessus peuvent être livrés en ampoules de 2 ml, à employer suivant les méthodes courantes et en ampoules de 0,8 ml pour l'utilisation dans le "Field Monitor" ou boîte filtre de campagne préparée par la Société Millipore. Ce dispositif consiste en une membrane filtrante montée sur un support en matière plastique, stérilisé et prêt à l'emploi, dans lequel on peut introduire, directement après la filtration, le milieu de culture. Cet appareil présente évidemment l'avantage d'éliminer toute source de contamination accidentelle puisque toutes les opérations (filtration, lavage, culture) ont lieu dans le même appareil clos. Le temps des manipulations est considérablement réduit, l'appareil monté et stérilisé étant immédiatement disponible.

Millipore recommande aussi un liquide de captage pour aérosol contenant :

Gélatine	2 g
Bouillon de coeur et de cerveau	37 g
Eau distillée	1000 ml
Phosphate disodique	4 g
Antimoussant	0,1 ml

Ce milieu est utilisé dans le coffret pour analyse de la contamination dans les hôpitaux (n° XX 72037) comprenant une boîte filtrante de campagne.

b) Coloration.

De très nombreuses méthodes de coloration ont été proposées, les premières ayant l'inconvénient de colorer trop fortement la membrane par rapport aux germes et de présenter ainsi peu de contraste. La membrane Millipore peut être transférée du milieu de culture sur un tampon absorbant saturé de colorant de telle façon que celui-ci diffuse au travers de la membrane ; ou bien le colorant peut être filtré à travers la membrane, après être demeuré en contact avec celle-ci quelques minutes, et l'excès de colorant éliminé par plusieurs lavages successifs à l'eau distillée stérile.

Le bleu de Loeffler est un excellent colorant général, mais n'est pas très utilisé. La résazurine (CARTER et Coll. (25)) a été employée en solution à 0,05 pour cent pour colorer Bacillus anthracis, Eberthella typhosa, Shigella flexneri, Brucella abortus suis, Pasteurella pestis. La membrane est placé sur un tampon absorbant

préalablement trempé dans la solution colorante. La réduction a lieu en trois minutes en commençant par les bords de la colonie puis en allant vers le centre. La coloration bleue initiale du colorant vire au rose puis à l'incolore après quelques heures au contact des germes, alors que la membrane demeure bleue ou devient légèrement rose : cela dépend de la concentration bactérienne.

Le bleu de méthylène MF (mélange de bleu de méthylène et de fuschine dont nous donnerons plus loin la formule) produit une excellente coloration générale, en particulier pour Staphylococcus pyogènes aureus, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus species, etc...

Le bleu Victoria (ERLICH (42)) est employé en dilution au 1/10e d'une solution à 0,1 pour cent, ajustée à pH = 10, à l'aide de lessive de soude, au moment de l'emploi. Le colorant doit demeurer 2 à 5 minutes en contact avec la membrane dans l'appareil à filtrer. Si l'on veut obtenir un contraste plus grand entre la membrane et les germes, on colore au préalable la membrane avec une solution alcoolique de fuschine : les microorganismes apparaissent colorés en bleu foncé sur le fond rose.

Il est cependant préférable de colorer soit les microorganismes, soit la membrane seule, pour avoir un contraste plus grand.

Le vert malachite est utilisé par FIFIELD et HOFF (45) en solution à 0,01 pour cent pour colorer la membrane en vert clair tandis que les germes demeurent incolores. Pour cela, la solution est versée pendant 3 secondes sur la membrane, puis éliminée par filtration. Les particules étrangères prennent la même coloration que la membrane ou deviennent plus foncées.

Au contraire, le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium en solution à 0,2 pour cent colore en quelques minutes les bactéries en rouge sombre tandis que la membrane reste incolore.

D'autres techniques ont été proposées pour améliorer quelques points particuliers :

- Pour les spores de Bacillus subtilis, SHANAHAN et Coll. (140) recommandent d'utiliser un colorant à base de cristal violet préparé comme suit : 4 gouttes de solution alcoolique à 2 pour cent de cristal violet sont ajoutées à une concentration connue de spores en suspension dans 10 ml de liquide de dilution ; on ajoute ensuite 3 gouttes de Triton 20 en solution à 10 pour cent. L'ensemble est porté à ébullition puis laissé reposer 8 minutes et est alors filtré à travers la membrane Millipore. Celle-ci est lavée avec un mélange à parties égales d'alcool éthylique et d'eau distillée puis est mise à sécher : les spores sont colorées en violet.

- Ces mêmes auteurs ont préconisé pour certaines souches de Serratia marcescens résistantes aux colorants usuels, l'emploi de 3 gouttes de fuschine basique en solution alcoolique à 2 pour cent et de 2 gouttes de phénol à 5 pour cent ajoutés à 10 ml de suspension de germes. Le tout est chauffé 5 minutes, refroidi puis filtré à travers la membrane : les germes apparaissent en violet sur le fond blanc.

- Certains germes ont une affinité particulière pour des colorants particuliers : c'est ainsi que pour Mycobacterium tuberculosis, WAYNE (156) utilise une solution saturée de rouge neutre dans l'alcool à 95° acidifiée avec 1 pour cent d'acide chlorhydrique concentré.

- Pasteurella pestis peut être coloré en jaune à l'aide d'une solution à 0,1 pour cent de quinacrine. Le genre Neisseria apparaît en rouge sombre sous l'action d'une solution à 1 pour cent de chlorure de dihydro-tétraméthyl-para-phénylènediamine tandis que les Coliformes donnent une coloration dorée à reflets métalliques caractéristiques ou "golden sheen" sur le milieu MF Endo.

Enfin, ECKER et LOCKHART (40) ont mis au point une technique rapide sur membrane pour compter directement les microorganismes dans de petites prises d'essai : la membrane est divisée en plusieurs parties grâce à un trait de graisse qui forme un film entre chaque partie ; dans chaque carré ainsi formé, à l'aide d'une pipette Pasteur, on filtre les solutions à étudier ; une solution d'acide picrique à 1 pour cent dans du sérum physiologique est filtrée à son tour comme fixateur puis une goutte de fuschine acide à 0,1 pour cent de pH = 3 est déposée sur chaque carré 1 minute, puis filtrée. Les germes apparaissent en rouge foncé sur un fond rose clair ; la fixation préalable augmente le contraste.

Il existe donc une diversité très grande de méthodes de coloration, aucune n'étant parfaite ; il convient de choisir celles qui sont les plus faciles à employer dans les cas généraux, en se réservant d'utiliser chacune pour des cas particuliers bien précis.

Résultats.

Les travaux de MIQUEL (95) sont probablement les plus complets effectués à ce jour, car il a analysé l'air, chaque jour, pendant plusieurs années, tant dans le centre de Paris qu'au Parc Montsouris il a montré qu'il y a une variation saisonnière importante et que la plupart des bactéries retrouvées à l'extérieur proviennent de la surface du sol d'où elles sont envoyées dans l'air, avec les particules sèches du sol, par le vent ; par contre, la pluie a une action complexe : tantôt une averse purifie l'air dans des proportions très importantes, tantôt elle augmente la concentration en germes dans le cas d'un temps humide. D'autre part, il a remarqué qu'il y a une périodicité journalière dans le nombre total des bactéries de l'air

différant, suivant l'endroit du prélèvement : à Montsouris, il a trouvé deux maximums quotidiens à 8 heures et à 20 heures, et deux minimums à 2 heures et à 14 heures ; au contraire, dans le centre de Paris, la plupart du temps il y a un seul maximum à 14 heures et un minimum à 2 heures, mais en automne, les deux pics se retrouvent aux deux endroits. Bien que MIQUEL ait avancé plusieurs hypothèses, aucune explication satisfaisante de ce phénomène n'a été trouvée.

BESSON (9), dans les prélèvements de routine qu'il a effectués rue des Blancs-Manteaux, a pu trouver les germes suivants :
- le 1er janvier 1955 : Sarcines jaune et blanche, Staphylocoque blanc, Bacille subtilis, Staphylocoque rouge, Champignons des genres Debaryomyces, Hormodendron, Verticillium ;

- le 2 janvier 1955 : Sarcine jaune, Staphylocoque blanc, Champignons des genres : Torulopsis, Aspergillus (fumigatus), Hormodendron, Verticillium.

Des expériences rapportées par MAURANGES (87), ont été faites du 19 avril 1957 au 17 juillet 1960 sur la flore microbienne de l'air marin, à l'occasion de voyages entre Hambourg, la côte occidentale d'Afrique et la côte orientale d'Amérique. Cet auteur donne le détail des différents germes recueillis, par famille, par genre et par espèce, suivant les différentes zones ; il faut remarquer que sur l'ensemble du territoire exploré, les genres Bacillus et Micrococcus représentent 90 pour cent de la totalité des germes recueillis. D'autres auteurs ont étudié l'air à haute altitude et particulièrement lors de voyages en avion au-dessus du Canada (66, 67). Mais la plus grande partie des travaux a été orientée vers la composition de l'air dans des endroits bien déterminés. GORDON (53) a analysé l'air sur la terrasse de la Chambre des Communes où il a trouvé fréquemment Welchia perfringens et des germes du genre Streptococcus.

FORBES (46), utilisant la méthode des boîtes de Pétri ouvertes dans le métro londonien et dans les rues, a obtenu des nombres variant de 1960 à 29. 600 par m3 (moyenne 10. 500) à 37°, tandis qu'à 20° il obtient des nombres plus élevés de 5600 à 85. 000 (moyenne 29. 600). Les germes pathogènes sont rares.

BUCHBINDER, SOLOWEY et SOLOTOROVSKY (19) ont trouvé dans les rues de New-York 260 à 543 germes par m3 et seulement 120 germes par m3 dans Central Park.

BOURDILLON (14) a donné plusieurs tableaux des résultats obtenus avec son collecteur à fente, par comparaison avec la méthode de sédimentation, sur le toit d'un hôpital, dans la rue et dans les cours de cet hôpital : Sur le toit de l'hôpital : 14 à 521 bactéries par m3, avec une moyenne de 72. Très peu de germes pathogènes, les

plus importants étant Welchia perfringens et Staphylococcus aureus. Au niveau du sol : de 54 à 400 par m3. Dans les salles de l'hôpital : par temps froid avec toutes les fenêtres fermées, les nombres trouvés sont beaucoup plus élevés, même lorsque les salles sont calmes (pas de lits refaits et de pansements, ni malades se promenant). En été, avec les fenêtres ouvertes, le nombre est considérablement réduit.

Les auteurs russes estiment que dans l'air des locaux hospitaliers on trouve de 4520 à 92. 500 microbes par m3 appartenant à différentes microflores saprophytes et à quelques cocci pyogènes : Streptocoque hémolytique et Staphylocoque que l'on met en évidence par les méthodes préconisées ci-dessus par YAROCHENKO.

V. FREDETTE (48), dans un article publié dans le journal belge l' "Hôpital" (juin 1962) (et repris dans la "Semaine Médicale" du 8 novembre 1962) remarque l'importance de la présence de Welchia perfringens dans les salles d'opération. Ce germe, responsable en 1955 d'une épidémie de gangrène gazeuse dans un hôpital canadien, a été retrouvé dans toutes les salles d'opération examinées, malgré un système de ventilation qu'il met d'ailleurs en cause chaque fois, quel qu'en soit le modèle.

D'autre auteurs se sont intéressés à l'air des locaux occupés : écoles, usines, cantines, maisons habitées avant et après les travaux domestiques.

WILLIAMS, LIDWELL et HIRCH (164) donnent le tableau n° 2 ci-après.

oo0oo

TABLEAU N° 2

Nombre de Bactéries dans l'air de lieux habités

Lieu de Prélèvement	Nombre d'essais	Flore totale (nombre de colonies par dm^3)	Nombre total de Streptocoques (colonies par dm^3)	(pour cent)	Str. salivarius (colonies par dm^3)	(pour cent)
Ecoles primaires						
Maternelles	300	2.100	45	2	9	0,39
Classes	400	1.700	30	1,7	4,6	0,29
Vestiaires	7	4.500	90	2,6	16	0,37
Bureaux						
F.C.	304	900	6	0,7	0,6	0,08
B.R.	157	1.300	-	-	0,9	0,08
G.T.S.	89	900	-	-	0,018	0,02
S.C.	134	1.000	6	0,5	0,6	0,05
W.S.	20	970	1,58	4,8	2,1	0,22
N.I.	36	1.020	8	0,8	0,9	0,09
Usine de chaussures	180	900	-	-	5	0,35
Maison d'habitation :						
peu de mouvement	127	150	-	-	-	-
ménage	24	240	-	-	-	-
Chemin de fer Métropolitain	6	1.200	8	0,7	-	-
Rue	47	150	0,75	0,5	0,012	0,08

N.B. Le volume de l'air analysé a été :

- pour la flore totale de 50 à 280 dm^3,
- pour la recherche totale des Streptocoques et pour Str. salivarius dans les écoles : de 280 à 560 dm^3,
- pour Str. salivarius ailleurs, de 2.800 à 5.600 dm^3 par essai.

CHAPITRE III

LA VIABILITE DES GERMES ENVOYES EN AEROSOLS

Avant d'entreprendre l'étude de la méthode de prélèvement que nous avons mise au point, il nous faut encore considérer le problème de la production des aérosols et de leur devenir, ainsi que celui de la viabilité et de la virulence des germes envoyés ainsi dans l'air.

Pour l'étude au laboratoire, il a été nécessaire de mettre au point des appareils permettant de pulvériser dans l'air des suspensions liquides ou séchées de bactéries. De nombreux types ont été proposés ; ils ne diffèrent pas de ceux qui sont utilisés pour la production d'aérosols variés ; cependant, parmi les caractères essentiels des aérosols destinés à cette étude, il faut insister particulièrement sur les points suivants : la stabilité dans l'air, la pénétration pulmonaire et l'homogénéité dans la taille des particules et dans le nombre de bactéries.

Ces critères entraînent l'emploi d'appareils soigneusement étalonnés et d'un débit assez important. La plupart des auteurs utilisent des appareils en verre où le courant d'air entraîne un jet de liquide très fin aspiré par cet air et qui s'écrase brutalement sur une surface en verre formant un brouillard de particules. Les plus grosses d'entre elles sont retenues par les pointes en chicane de colonnes de Vigreux à plus ou moins d'étages. MUROMTSEV et NENACHEV (105) obtiennent un aérosol bien dispersé, stable et de grand débit grâce à l'emploi d'ultra-sons. Un pièzo-élément (au titanate de baryum) est monté au fond d'un bac réfrigérant. Les oscillations ultrasonores sont focalisées par une lentille à la surface du liquide réfrigérant. Le liquide à pulvériser est placé dans un matras de verre plongé dans le liquide refroidi : le fond du matras est formé d'une pellicule de nylon. Un tuyau sert à l'entrée de l'air, l'autre à la sortie de l'aérosol formé.

ZENTNER (168) a proposé un générateur d'aérosols uniformes dans lequel les gouttes sont arrachées par un système vibratoire entretenu.

Les aérosols secs de bactéries lyophilisées sont de plus en plus utilisés. Au moment de leur production, ces aérosols sont à l'état de poussières mais, étant donné leur hygroscopicité, ils ne conservent pas longtemps cet état dans l'air humide.

Stabilité dans l'air.

Selon la taille des particules de l'aérosol, celui-ci, peu après sa formation, va subir des transformations (ROSEBURY (131), puis BOLOTOVSKIY (11). Selon la loi de Stokes, les plus grosses particules vont sédimenter rapidement :
U = vitesse de sédimentation (système C. G. S.)

$$U = \frac{2}{9} \times \frac{r^2 \times g \times \rho}{\mu}$$

r = rayon en cm de la gouttelette ; g = accélération de la pesanteur ; ρ = densité des gouttelettes ; μ = viscosité dynamique du milieu de chute. Pour l'air $\mu = 2 \times 10^{-4}$ poises. Les gouttelettes d'eau ($\rho = 1$) d'un diamètre de 5 μ ont une vitesse de chute de 2,50 m à l'heure, celles de 1 μ, de 10 cm. Si l'aérosol est envoyé dans une pièce close, le temps de vie λ, si l'on tient compte seulement de la loi de Stokes, est défini par

$$\lambda = \frac{2,3\ U}{h}$$

U = vitesse de sédimentation, h = hauteur de la chambre.

Par conséquent, les particules d'aérosols, pour ne pas donner naissance à une pluie ou à un brouillard tombant trop vite, doivent avoir un diamètre de 1 à 5 μ ; de plus, en fonction du temps, la taille des particules de l'aérosol va s'uniformiser, seules les plus petites restant en suspension.

Mais si l'air est agité, la perte par chute d'un nuage d'aérosol sera très faible et les bactéries seront transportées très loin. (1)

---

(1) Le rôle du vent est en effet capital dans le transport des particules : pendant une tempête, l'Angleterre du Sud a été recouverte par une poussière de sable venant du Sahara (MILL et LEMPFERT (94)).

La dilution d'un nuage d'aérosol bactérien par diffusion dans l'atmosphère est régie par la loi de la diffusion des gaz lorsque le diamètre des particules est de 1 à 5 μ. Des essais de diffusion d'un aérosol bactérien ont été effectués au large des côtes Atlantique des Etats-Unis avec Serratia marcescens : on a retrouvé des bactéries à plusieurs centaines de kilomètres. D'autres, effectués à Los Angeles avec des particules fluorescentes ont permis de suivre le chemin parcouru.
En cas de pluie, la perte par lavage est proportionnelle à la taille des particules d'aérosol, mais dépend aussi de l'intensité et de la durée de la précipitation : elle est faible si la pluie a une intensité moyenne (PERKINS et VAUGHAN) (117).
Les autres facteurs physiques sont moins importants :
Ce sont : la coalescence par gravitation mais qui, pour des particules de moins de 15μ, joue un très faible rôle, comme l'a calculé LANGMUIR ; la coalescence brownienne car, à chaque collision, deux gouttelettes pourront se fondre en une seule.
Si n est le nombre de gouttelettes dans l'unité de volume de l'aérosol, la variation de n par coalescence brownienne est de la forme :

$$\frac{dn}{dt} = \frac{4}{3} \quad \frac{RT}{IN} \times n^2$$

R = constante des gaz, T = température absolue, N = nombre d'Avogadro, t = temps, ce qui donne $n = \frac{No}{1 + \frac{4}{3} \frac{RT}{IN} \times Not}$

No étant le nombre de gouttes au temps t = 0
Une diminution de moitié est obtenue quand le dénominateur est égal à 2 soit

$$t = \frac{3}{4} \frac{IN}{RT\ No} = 3 \times 10^{11} \text{ secondes, ou environ } 1,33 \times 10^{6} \text{ jours.}$$

CHICHKIN (28) a montré expérimentalement que pour un rayon de particules de 1μ et une humidité de l'aérosol de 1 g/m^3, la réduction de moitié des particules par coalescence brownienne se produit en 70 heures.

La coalescence par turbulence est aussi très faible et dépend de l'état statique de l'air de la pièce ;

enfin, la coalescence électrique ne joue que pour des particules de signes contraires ; or, dans un aérosol, toutes les particules ont le même signe ou sont neutres. En revanche, ce phénomène sera très important dans l'étude de la destruction des aérosols par des aérosols de signes contraires.

Un autre problème à considérer est le changement spontané de taille des particules entre le moment de l'émission et celui de

l'étude. Selon le degré hygrométrique et la température de l'environnement, les particules peuvent voir leur taille diminuer ou grandir : MUROMTSEV et NENECHEV ont montré en 1960 qu'un aérosol de Serratia marcescens en bouillon nutritif, formé par ultrasons, de particules de 1 à 7 μ présente, après 10 minutes, une dimension moyenne des particules de 0,2 à 1 μ dans les conditions de leurs essais.

Il est bien évident que le milieu de suspension joue un rôle très important. En 1957, KETHLEY, COWN et FINCHER (68), dans une étude des aérosols bactériens, ont effectué des recherches systématiques sur la taille des particules en fonction de l'humidité. Connaissant le nombre moyen de bactéries par gouttelette, obtenu en comptant au microscope électronique le nombre de cellules bactériennes et le nombre de particules (soit 672 cellules pour 417 particules, ce qui donne 1,6 bactérie par goutte à l'émission), sachant que le milieu dispersé contenait 140×10^7 bactéries par ml, ils ont pu calculer le nombre de gouttes produites par 1 ml de milieu (soit 86×10^7 gouttes). Le volume moyen de chaque particule étant ensuite calculé (1170×10^{-12} ml), ces auteurs ont pu obtenir le diamètre de la sphère équivalente soit 13 μ. Cet aérosol, après quelques minutes dans la chambre de dispersion, est alors formé de particules dont le diamètre moyen est de 0,8 μ (mesuré au microscope à contraste de phase sur les gouttelettes recueillies sur lames enduites d'huile). Par conséquent, chaque particule de moins de 1 μ est formée d'une bactérie au moins (mais pas plus de deux) entourée de solides, ou de liquides à basse pression de vapeur, provenant du milieu de suspension des bactéries, représentant une gouttelette de 13 μ, ce qui correspond à une concentration très grande si l'on calcule le volume des sphères correspondantes

Suivant la composition du milieu de suspension, les résultats sont très variables. Si l'on part d'une suspension de bactéries en milieu à l'extrait de viande, pour une humidité relative de 20 pour cent la taille des particules obtenues est de 1,8 μ ; si on ajoute au milieu 1 pour mille de chlorure de sodium, elle est de 1,9 μ; mais si l'humidité relative est de 80 pour cent dans le premier cas, la taille des particules est de 2,2 μ et dans le deuxième de 2,6 μ. Par contre, en milieu gélosé la taille des particules est beaucoup plus importante : de 2,6 μ pour une humidité relative de 20 pour cent, elle passe à 4,2 μ pour une humidité de 95 pour cent. Si, au contraire, on prend des bactéries lavées et mises en suspension dans l'eau distillée, leur diamètre moyen est de 0,6 μ pour une humidité relative de 20 pour cent et ne sera que de 0,5 μ pour une humidité relative de 80 pour cent soit un changement très faible par rapport à l'humidité ; si cette suspension est réalisée en eau glycérinée à 0,37 pour cent, le diamètre moyen varie dans des proportions beaucoup plus sensibles.

Tous ces travaux montrent le rôle capital de l'humidité dans l'étude des aérorols bactériens. Ils expliquent aussi le devenir des aérosols naturels formés par les gouttes de salive qui se transforment rapidement en ce que WELLS (161) a appelé les "noyaux de condensation" dans lesquels les bactéries sont entourées d'une gaine de protéines et de mucine concentrée et dont la taille est de l'ordre de 1 à 2 μ . Dans les aérosols formés par les appareils à air comprimé, l'évaporation du liquide des gouttelettes est très rapide, même si l'air est saturé de vapeur d'eau. L'évaporation complète de l'eau d'une gouttelette de 13 μ dans l'air à 99 pour cent d'humidité relative ne demande que 5,7 secondes. Lorsque le milieu contient des cristalloïdes ou des liquides à basse pression de vapeur, l'évaporation se poursuit jusqu'à ce que la pression à la surface de la goutte soit égale à celle existant dans l'air (LEAVITT et KAYE (79)).

ZENTNER rappelle qu'une réduction de 4 fois du diamètre des gouttes est souvent obtenue, donc que des gouttes de l'aérosol de 10 μ deviennent des gouttes de 2,5 μ ; mais il souligne aussi que les poussières et les aérosols de solutions concentrées peuvent par réhydratation grossir de 2 fois et demie.

Après ce rappel sur les conditions physiques de stabilité dans l'air et de constitution des aérosols bactériens, il nous faut étudier leur vitalité.
Celle-ci peut être définie comme la proportion de ses membres capable de se multiplier dans des conditions optimales de croissance. On peut donc admettre qu'un organisme est mort s'il ne s'est pas multiplié dans ces conditions.

Plusieurs procédés ont été proposés pour permettre d'apprécier cette qualité, mais ils ne sont pas toujours satisfaisants :

1° - la coloration vitale fondée sur le fait que la mort s'accompagne d'un changement de perméabilité de la membrane pour les colorants. On peut employer :

- des colorants vitaux ordinaires : bleu de toluidine, thionine, rouge neutre ;
- des colorants fluorescents comme l'orangé d'acridine ;
- des colorants redox qui ne sont plus réduits en cas de mort de la bactérie, comme les sels de tétrazolium.

2° - la culture sur lame (POSTGATE et Coll. (122)): des anneaux de cuivre de 20 mm de diamètre sont placés sur des lames de verre, remplis de 0,22 ml de milieu gélosé chaud ; une suspension à 100 millions d'organismes par ml est déposée sur la surface du film de gélose et laissée en place 10 mn. Le tout est alors muni d'un couvercle et mis à l'étuve à 37° C pendant des temps variant

de 2 à 4 h. Après refroidissement de la préparation, celle-ci est examinée au microscope à contraste de phases. Le nombre de micro-colonies est déduit du nombre total des objets microbiens.

Quels sont les principaux facteurs qui commandent la durée de vie des microorganismes dans les aérosols ?

KETHLEY a défini un taux de mortalité k tel que

$$k = \frac{\log No - \log N_1}{t}$$

No = nombre de microorganismes vivants au temps t = 0

N_1 = nombre de vivants au temps t (en minutes), mais il faut tenir compte de la chute physique que nous avons notée plus haut. Si on appelle Kc ce taux de chute, le taux réel de mortalité devient

$$k_t = \frac{\log No - \log N_1}{t} - Kc$$

les conditions physiques qui règlent le taux de mortalité sont : la température, le taux d'humidité, le temps et indirectement le milieu de suspension qui joue un rôle par rapport à l'humidité.

a) Température. Elle facilite l'évaporation donc son élévation aura des conséquences qui dépendront du degré hygrométrique. Presque toutes les expériences ont été effectuées de + 18° à + 22° C dans les conditions de températures moyennes des locaux. Il est à noter qu'en cas d'une éventuelle agression bactériologique, l'aérosol envoyé dans l'air se réchaufferait progressivement en approchant de la terre, mais que son envoi dans l'air très froid des atmosphères élevées ne serait en rien préjudiciable à sa vitalité ; tout au plus, remarquerait-on un temps de latence plus long pour la croissance des germes car, afin d'éviter une cristallisation de l'eau intracellulaire, ils seraient sans doute mis sous forme lyophilisée et ils ne reprendraient leur forme normale qu'au contact de l'humidité de l'air.

b) Humidité. C'est le facteur le plus important, puisqu'il influe sur l'évaporation de l'eau des gouttes et modifie la concentration de "l'entourage" de la bactérie ; la composition de ce milieu est alors primordiale, la concentration en cristalloïdes étant très toxique, celle des protéines formant au contraire un film protecteur.

VLODAVETS (1963) (153) a déterminé la vitalité d'un aérosol de Serratia marcescens en sérum physiologique à 18° C et avec une humidité relative allant de 13 à 78 pour cent :
Il a obtenu les résultats rassemblés dans le Tableau n° 3.

Tableau n° 3

Taux d'humidité	Mortalité
13 %	100 %
44 %	86 %
60 %	24 %
78 %	18 %

De même, BATEMAN et Coll. (5) ont remarqué que la vitalité d'une suspension de Serratia marcescens "aérolisée" passe par deux minimums : un situé aux basses humidités (20 à 30 pour cent), l'autre aux fortes (90 pour cent). KETHLEY, COWN et FINCHER en 1957 ont comparé le taux de mortalité d'un aérosol de Serratia marcescens en fonction du temps, suivant le degré hygrométrique et la nature du liquide de suspension. Les milieux furent choisis comme étant représentatifs des différentes conditions sous lesquels les microorganismes peuvent être trouvés dans l'air ; à partir d'eau distillée, les germes existent à l'état libre dans l'air avec un minimum d'impuretés inertes ; dans le bouillon à l'extrait de viande, ils sont entourés d'une gaine de protéines ; dans l'eau glycérinée, d'un liquide non toxique, hygroscopique ; si au bouillon à l'extrait de viande on ajoute 1 pour mille de chlorure de sodium, la gaine de protéines contient soit des cristaux, soit une solution saline presque saturée. (Il faut remarquer que les taux de mortalité pour cet essai ont trait à la période qui suit l'équilibration à l'état d'aérosol). Les résultats suivants ont pu être mis en évidence :

- pour l'eau distillée, les bactéries meurent assez vite à toutes les valeurs de l'humidité sauf aux valeurs extrêmes ;

- pour l'eau glycérinée, le taux de mortalité est constant ;

- pour le bouillon à l'extrait de viande, il s'abaisse fortement au-dessous de 80 pour cent d'humidité, sauf lorsque le bouillon contient en outre 1 pour mille de chlorure de sodium, ce qui augmente la mortalité du simple au double.

Il est à remarquer que dans le milieu à l'extrait de viande, avec 40 pour cent d'humidité relative et à + 20° C, passées les premières minutes d'établissement de l'équilibre, le nombre de bactéries vivantes ne change pas sensiblement pendant deux heures.

c) Temps. L'influence du temps est souvent difficile à séparer de celle de l'humidité ou de la température. WEBB (157) a étudié le taux de mortalité d'un aérosol bactérien pendant cinq heures. Il a mis en évidence deux étapes dans cette mortalité : la première se produisant très rapidement dans les minutes suivant l'envoi de l'aérosol et la seconde survenant plus tard et plus lentement.

Cette mort semble en corrélation à la fois avec la température et l'humidité : elle pourrait être due à un mouvement des molécules d'eau intra et extra-cellulaires, conduisant à une rupture de la paroi naturelle des protéines cellulaires.

Les autres facteurs importants de la vitalité des bactéries envoyées en aérosols sont le choix de la souche, la nature du milieu de culture, l'âge de la culture, le pH et la température d'incubation.

GOODLOW et LEONARD (52), à Fort Detrick, ont montré que des mutants thermophiles de divers germes pathogènes résistent mieux à la mise en aérosol que les germes sauvages ; il en est de même avec une souche supportant une forte concentration en chlorure de sodium. En outre, ils ont montré que les bactéries non proliférentes, ou celles en phase de latence, sont beaucoup plus résistantes à l'aérosolisation que les bactéries en phase logarithmique de croissance.

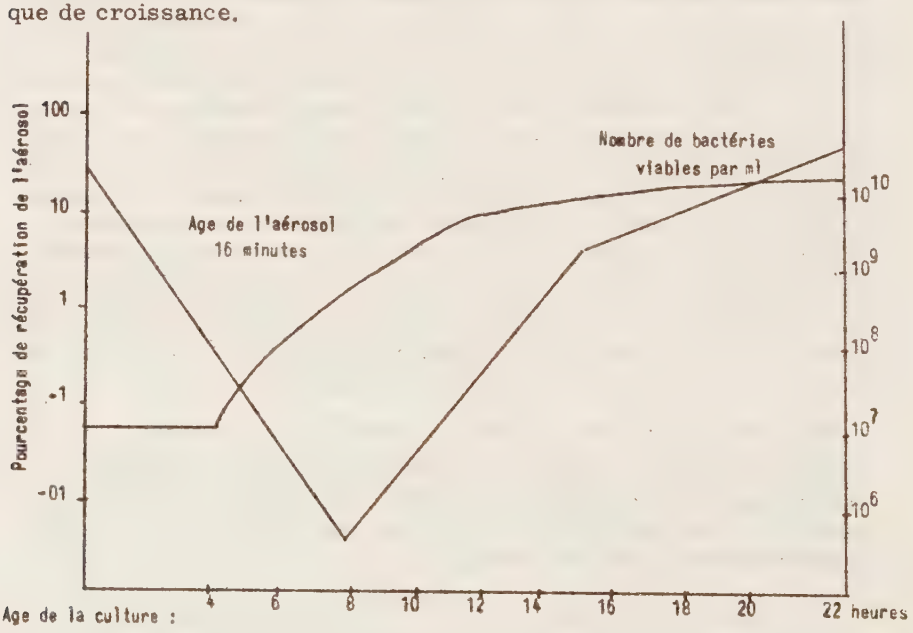


FIGURE N° 1

Stabilité d'un aérosol de Serratia marcescens en fonction de l'âge de la culture.

Les bactéries résistantes dans les aérosols deviennent sensibles après traitement à la ribonucléase ou au lysozyme ; l'exemple le plus net nous est donné par Escherichia coli, très perméable aux ions, aux petites molécules, aux sucres et aux peptides (ce qui lui donne sa réaction Gram négative) qui est très sensible, tandis que Staphylococcus citreus et Staphylococcus albus (Gram positifs) ne sont pas aussi perméables et, de ce fait, sont beaucoup plus stables en aérosols. WEBB (158) a montré que certains composés chimiques peuvent protéger les cellules s'ils sont ajoutés avant l'aérolisation. Cette propriété semble liée à la présence dans les composés d'une fonction amine ou alcool secondaire ; de plus, pour une protection maximale, il faut qu'ils soient substitués en 6. On utilise ainsi des amino-acides, des polypeptides, certains sucres, des polyhydroxycyclohexanes.

De leur côté, DELWICHE et Coll. (33) ont montré que l'on empêche la perte de virulence de Pasteurella pestis en ajoutant au milieu de culture de l'acide aspartique ou du bicarbonate de sodium ou en le maintenant sous atmosphère d'azote.

La virulence des germes peut aussi diminuer très vite dans l'aérosol : c'est ainsi que celle de Pasteurella pestis et Pasteurella tularensis décroît plus vite que leur vitalité : un aérosol de P. pestis tuant 100 cobayes par voie respiratoire s'il est âgé de 5 minutes, n'en tue plus que 10 s'il est âgé de 45 minutes, bien que le nombre de germes vivants ait peu diminué.

La taille des particules de l'aérosol a aussi son importance : un aérosol de P. pestis ou de P. tularensis de diamètre de 1 à 5 μ tue les animaux, par voie respiratoire, de pneumonie ; si les particules ont 15 μ , les cobayes ne meurent que lentement de septicémie tularémique sans signe de pneumonie et dans le cas de P. pestis, la mortalité devient très faible : les grosses particules sont arrêtées par les voies respiratoires supérieures tandis que les plus petites pénètrent jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Les particules trop fines de 0,4 μ ressortent d'ailleurs des poumons avec l'air expiré, sans causer de dommages.

Dans les méthodes de détection des bactéries envoyées dans l'air dans ce but agressif, nous devrons donc tenir compte des exigences ainsi imposées à l'"expéditeur", de l'état physique et physiologique des bactéries, ainsi que de la nature des espèces bactériennes utilisables.

Le "Bulletin of the Atomist Scientist" (23) a publié une liste des maladies infectieuses contagieuses, humaines ou animales, qui semblent les plus vraisemblablement utilisables dans un but militaire. On y trouve évidemment toutes les bactéries à fort pouvoir épidémique et à pouvoir pathogène intense.

oOo

DEUXIEME PARTIE

ooOoo

CHAPITRE I

TECHNIQUE PERSONNELLE DE PRELEVEMENT DES BACTERIES DE L'AIR

Pour atteindre le but fixé, nous avons conçu un appareil de prélèvement comportant un certain nombre d'éléments (fig. 2). Une pompe à vide assure une dépression réglable, dans un barboteur contenant le liquide de prélèvement. Le préleveur (fig. 3) est relié à un flacon contenant une solution de formol destinée à arrêter les bactéries qui auraient pu échapper. Il est entouré d'une résistance chauffante reliée elle-même à un zimmerstat, agissant pour maintenir la température à + 37° C. On trouve ensuite deux fioles contenant du chlorure de calcium desséché, qu'il est nécessaire de changer assez souvent, pour absorber la vapeur d'eau. Le deuxième flacon est relié directement au débimètre gyromètre Houdec [1], appareil destiné à mesurer le nombre de litres d'air prélevés par minute : le fluide dont on veut mesurer le débit passe par un tube conique s'élargissant de bas en haut et soulève un flotteur dont la position indique le débit. La perte de charge est minime et la fidélité de mesure est assurée à ± 1 pour cent. Le modèle employé appartient à la série 102, type "gyromètre sur pied pour laboratoire" gradué de 0,8 à 8 litres d'air par minute. Pour régler le débit-minute, nous disposons d'une fiole de Kitasato dont le bouchon porte deux robinets, l'un en rapport directement avec l'air, l'autre relié à la pompe. Par réglage de ceux-ci, nous obtenons le volume désiré.

Nous prélevons suivant des conditions indiquées plus loin en plaçant le barboteur à l'endroit précis du prélèvement et en le reliant par un tuyau de plastique plus ou moins long au flacon contenant le formol. Les premiers essais avaient été réalisés avec le montage inverse, c'est-à-dire d'abord le tuyau et le barboteur ensuite, mais il semble que les bactéries soient retenues électro-statiquement par la matière plastique et ne parviennent plus au préleveur. Nous avons vérifié ce fait en prélevant au même endroit pendant le même temps, 3 heures, avec le tuyau placé avant ou après le barboteur. Nous avons obtenu les résultats suivants :

---

[1] Houdec, 18 rue de Sébastopol, Choisy-le-Roi, Seine

1° - Tuyau de nylon avant le barboteur :

- boite témoin, ouverte pendant le prélèvement de 3 h. : 82 colonies

- total des colonies dans 10 ml de tampon (après numération) : 15 colonies,

ce qui donne 21 colonies par m3.

En prenant comme unité commune le nombre de colonies par cm2 de boite de Pétri, on obtient 1, 23 colonies pour la boite témoin et 0, 2 colonie pour l'essai.

2° - Tuyau de nylon après l'appareil de prélèvement :

- boite témoin : 33 colonies

- essai dans 10 ml : 110 colonies ou 154 colonies par m3, soit par cm2 de boite de Pétri : 0, 5 colonie pour le témoin et 1, 6 colonies pour l'essai.

Donc la présence du tuyau semble bien empêcher les bactéries d'arriver au barboteur. Par la suite, le tuyau de raccordement sera toujours placé après le préleveur.

Avant de discuter les modalités du prélèvement, nous allons exposer la technique à laquelle nous nous sommes finalement ralliés.

Nous introduisons stérilement dans le barboteur 10 ml d'une solution tampon phosphatée de formule suivante :

Chlorure de sodium : 7, 00 g.
Phosphate monoacide de sodium PO_4HNa_2, 12 H_2O : 1, 36 g.
Phosphate diacide de potassium PO_4H_2K : 0, 20 g.
Eau distillée q.s.p. : 1000 ml

stérilisée 30 mn. à + 120° C.

Nous ajoutons extemporanément à cette solution 1 ml de solution d'acide glutamique préparée comme suit : 1 gramme d'acide glutamique est dissous à chaud dans 50 ml de la solution tempon ci-dessus, amenée à pH = 7 par addition de lessive de soude et filtrée ensuite à travers une membrane Millipore HA, stérilisée par ébullition 20 mn. Conserver cette solution à la glacière. 1 ml de cette solution porté dans 20 ml de solution tampon phosphatée, donne une concentration de 1 p. mille. Il n'est pas possible de soumettre à l'autoclave cette membrane Millipore toute montée dans l'appareil spécial Millipore pour liquide (XX 20047 20) car, malgré tous nos essais, la membrane n'a pas supporté la stérilisation de 15 mn à

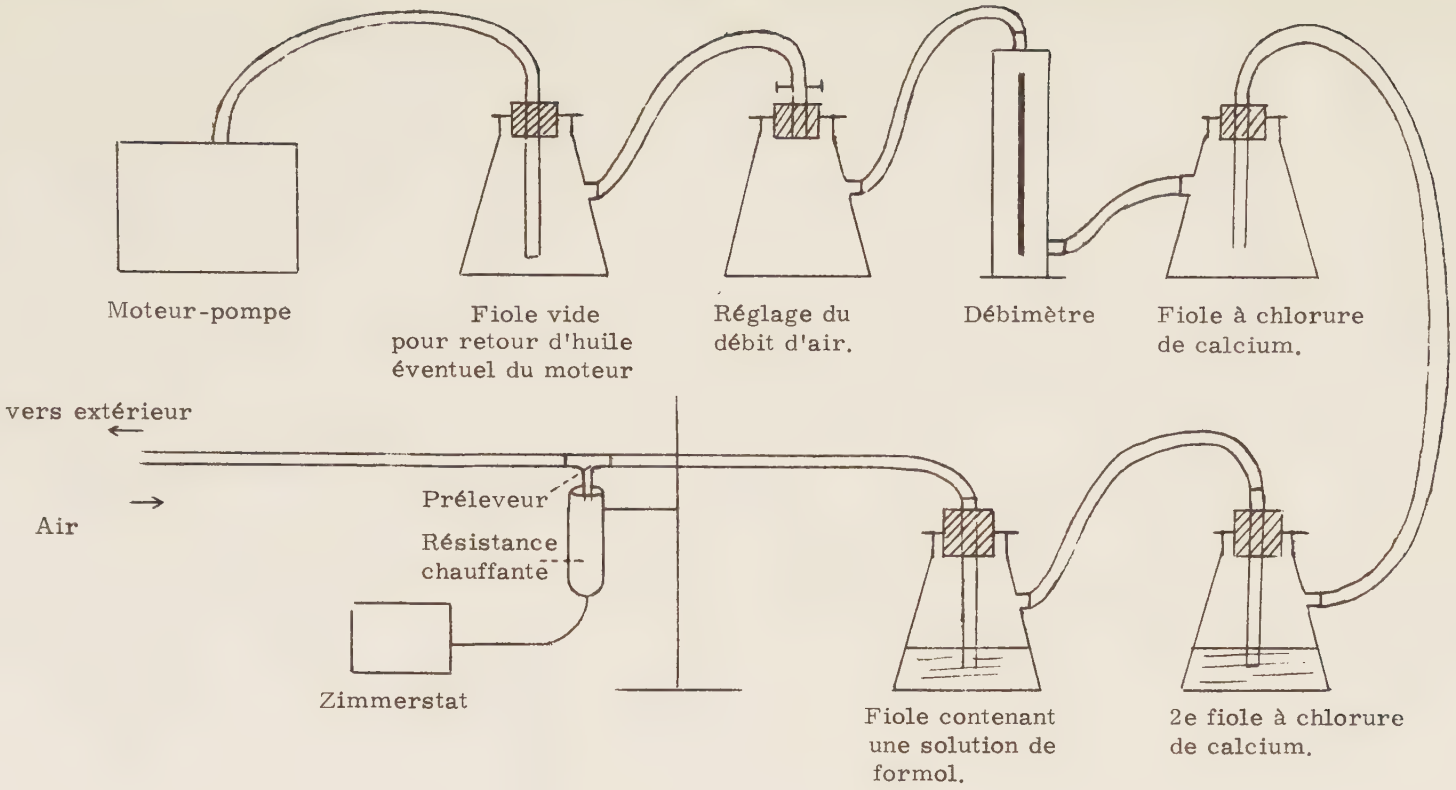


Schéma de l'appareil de prélèvement (fig. 2).

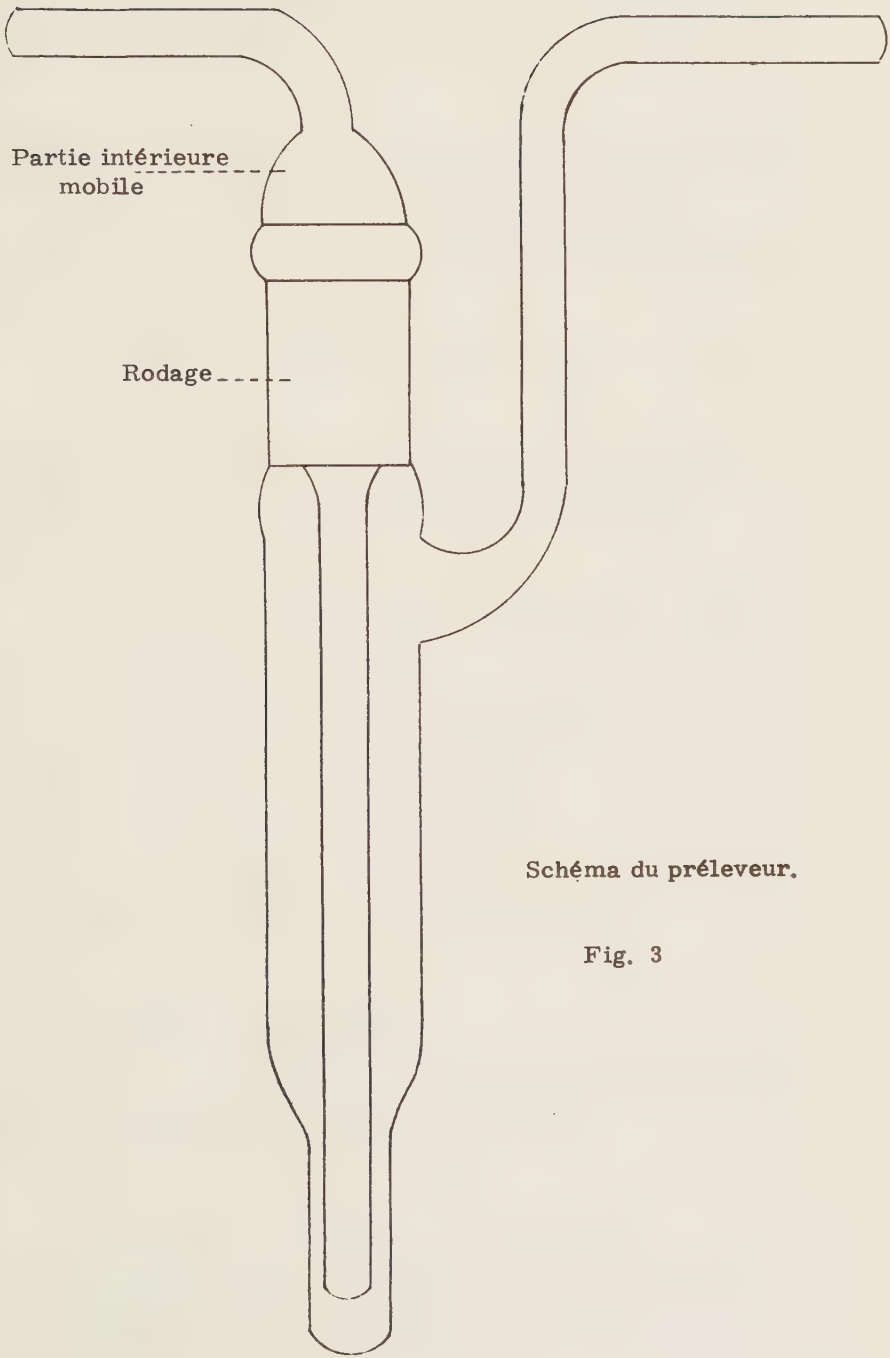


Schéma du préleveur.

Fig. 3

120°C qui est recommandée dans le manuel technique du fabricant : elle se fend en son milieu. Il est donc nécessaire de stériliser l'appareil à part à l'autoclave et d'éjouter la membrane au moment de la filtration, après l'avoir fait bouillir 20 mn environ dans de l'eau stérile.

Cependant, dans une sélection d'informations techniques parues chez Millipore en Mars 1965, on peut trouver la description d'un accessoire pratique permettant la stérilisation simultanée de la membrane et du support de filtres : il s'agit d'un couvercle spécial en caoutchouc qui s'adapte à l'entonnoir et égalise la pression pendant le passage à l'autoclave en laissant entrer et sortir l'air par un petit orifice prévu à cet effet.

Nous faisons alors passer l'air pendant 30 mn à un débit de 4 l/mn.

Il est possible, et même souhaitable, de maintenir pendant toute la durée du prélèvement le barboteur dans un bain-marie à 37°C ; le tièdissement du liquide collecteur constitue une sorte de préchauffage permettant de gagner quelques dizaines de minutes dans la multiplication des germes.

Nous versons ensuite le contenu du barboteur dans un tube à essai stérile en rinçant avec 10 ml de tampon qui sont ajoutés au liquide de prélèvement.

Nous avons finalement adopté cette méthode en nous fondant sur différents critères que nous allons étudier maintenant.

1° - Prélèvement en liquide des bactéries de l'air

MIQUEL (96) avait déjà signalé en 1888 que les milieux liquides semblaient préférables aux milieux solides et nous avons rappelé qu'il obtient des résultats près de 2 fois supérieurs en utilisant du bouillon plutôt que de la gélose.

2° - Nature du liquide de prélèvement

Il est préférable de prélever en solution tampon plutôt qu'en eau physiologique car on observe une activation de la croissance des bactéries (PLOMMET (120), (HERMIER (62)).

3° - Température

Le passage de l'air à travers la solution tampon abaisse assez notablement la température - de quelques degrés environ - ce qui contrecarre l'effet activateur du tampon. On sait qu'une grosse partie des microorganismes de l'air consiste en champignons que le

séjour à 37° C inhibe, alors qu'il suffit de laisser les boites de Pétri à la température du laboratoire pour les voir se développer rapidement. La meilleure température pour les bactéries de l'air semble être de 30° C durant 4 jours (1). Si un grand nombre de colonies se développe en un jour à 37° C ou en 2 jours à 20° C il y a contamination anormale de l'air d'après ces même auteurs. Ces conclusions sont très importantes en cas de pollution bactériologique volontaire, puisque le germe pathogène envoyé cultiverait certainement plus vite à + 37° C qu'à 30° C ou 20° C. Il faut mettre à part le cas de Pasteurella pestis qui cultive mieux à 25° C ; cependant, la difficulté peut être tournée par le fait que ce germe produit massivement des malico-déshydrogénase et lactico-déshydrogénase. En effet, SRIKANIAN, AGARWALA et SHRIVASTAVA (145) ont montré, en employant des "bactéries non proliférantes" de Pasteurella pestis en suspension dans une solution tampon à pH = 7 à laquelle on ajoute du glucose 0,1 M, que l'on obtient la réduction et la coloration du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium, avec le glucose comme substrat. Avec les acides lactique, succinique, isocitrique et même avec la cystéine, la coloration est obtenue rapidement quoique moins intense. Pour toutes ces raisons, on a donc adopté la température de 37° C pour le prélèvement en plaçant le barboteur dans une résistance chauffante avec thermostat.

4° - Durée du prélèvement.

Elle joue un rôle important dans l'évaporation du liquide tampon. Plus ce temps est long, plus le liquide s'évapore dans l'appareil. Mais si on augmente la hauteur et le volume de l'espace d'air au-dessus du liquide, la perte d'eau est réduite à quelques centièmes pendant un prélèvement de 140 à 280 litres d'air (LUCKIESH (81)). De même, dans un prélèvement en bouillon, de 10 à 15 mn, à 21 l/mn, dans l'"atomiser-bubler" de S. Moulton, les facteurs de correction dûs à l'évaporation ne semblent pas interférer dans les calculs (101).

Dans notre barboteur, les 10 ml de solution tampon arrivent au niveau inférieur de la courbure et l'évaporation n'est donc fonction que du temps de passage. Elle sera donc sensible pour des temps de 3 heures, beaucoup moins pour le temps de 30 mn qui est celui que nous employons. On a remarqué que le nombre des bactéries de l'air normal est extrêmement faible et que des prélèvements de 30 mn à 3 h donnent des nombres assez voisins (entre 10 et 200 colonies environ par m3). Par contre, en cas d'une éventuelle agression bactériologique, le temps de 3 h serait beaucoup trop long et on aurait un nombre de germes probablement trop important pour permettre la numération, si l'on s'en rapporte à une manoeuvre de guerre microbiologique décrite dans la presse spécialisée : un petit navire de surveillance côtière de la "US Navy" a pulvérisé en aérosol une culture de bactéries inoffensives, à trois kilomètres du rivage américain. L'aérosol a été réalisé par vent favorable de 45 ki-

lomètres à l'heure, soufflant de la mer vers la terre, sur une distance de trois kilomètres selon une ligne droite parallèle à la côte. Or, l'aérosol a couvert une superficie de 180 kilomètres carrés au bout de cinq heures. A l'extrême pointe de la nuée de bactéries, c'est-à-dire dans les terres à 43 kilomètres de la côte, un homme respirait une moyenne de 1 000 bactéries par minute. Un prélèvement de 30 minutes paraît donc amplement suffisant.

5° - Débit de l'air.

Le débit utilisé est de 4 l/mn mesuré avec le débimètre Houdec. Il est beaucoup plus lent que celui employé dans les différents appareils d'après le tableau dressé par DU BUY (37) :

Centrifugeuse de WELLS	34 l/mn
Funnel ("entonnoir")	28,9 l/mn
Slit sampler (BOURDILLON), piège à fente	28,3 l/mn
Bouteille par choc en liquide	24 l/mn
Bead bubler "Barboteur à billes de verre"	21 à 28,3 l/mn
Atomizer bubler	14 à 28,3 l/mn
Cascade Impactor, chocs en cascade	17,5 l/mn.

Notre débit est plus lent mais notre temps de prélèvement plus long (tous ces appareils ne prélèvent que durant dix minutes au maximum) ; nous obtenons sensiblement le passage d'un même volume d'air. D'autre part, les bulles qui se forment au passage de l'air dans le liquide, avec un débit plus fort, se briseraient dans la partie supérieure du barboteur et risqueraient d'entraîner avec elles quelques bactéries, ce qui fausserait le résultat.

oOo

CHAPITRE II

DENOMBREMENT DES GERMES

PAR COLORATION DIRECTE SUR MEMBRANE FILTRANTE.

Les premiers essais de prélèvement de l'air que nous avons effectués avec l'appareil décrit ci-dessus ont été de 45 mn et de 90 mn. Nous ensemençons ensuite directement 1 ml et 0,1 ml du liquide de prélèvement sur des boîtes de Pétri contenant soit :

a) de la gélose simple (bouillon peptoné, salé, gélosé) ;

b) du milieu Difco Tergitol 7 agar :

Tryptone Difco	10 g
Lactose	5 g
Chlorure de sodium	2,50 g
Bleu de bromothymol	0,25 g
Gélose	7,50 g
Tergitol 7	1,50 g
Eau distillée q. s. p.	500 ml

Après dissolution du milieu dans l'eau à ébullition, la couleur est vert foncé. Le pH étant de 6,5, on l'ajuste à 7,2 en ajoutant de la lessive de soude : la coloration devient alors vert-bleu. On stérilise 15 mn à + 120°C. Le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium est ajouté extemporanément à la concentration de 0,02 pour cent.

c) du milieu Difco Bacto Antibiotic I :

Extrait de viande de boeuf	1,50 g
Extrait de levure Difco	3 g
Peptone de caséine	4 g
Peptone de viande	6 g
Glucose	1 g
Gélose	15 g
Eau distillée q. s. p.	1000 ml

Après dissolution du milieu dans l'eau distillée à ébullition, celui-ci est ajusté à pH = 7, 2 et stérilisé 15 minutes à + 120° C. Le milieu au Tergitol 7 Agar nous sert de témoin ; en effet, la présence du Tergitol est inhibitrice pour la majorité des germes à une concentration assez élevée : ce phénomène a été découvert en essayant d'éliminer un bacille très résistant à la chaleur d'une souche de Streptomyces. Les travaux de BAKER et Coll. (3 bis) suggèrent les détergents comme moyen de se débarrasser de ce germe et le Tergitol fut choisi après quelques essais (121). La concentration inhibitrice de Tergitol pour Streptomyces sp. est supérieure à 1/40 000e mais cette concentration varie avec les germes.

Tableau n° 4

Germes	Tergitol 0	1/40000	1/20000	1/10000
E. coli	+++	+++	+++	+++
St. aureus	+++	+++	+++	0
B. subtilis	+++	+++	++	0
B. mycoides	+++	+++	0	0
B. spécial (résistant à la chaleur	+++	+++	0	0

Ce tableau n° 4 nous montre qu'Escherichia coli est le seul germe qui soit peu sensible à des concentrations élevées de Tergitol. C'est pourquoi, lorsqu'à ce milieu "Tergitol 7 Agar" est ajouté du chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium ou TTC qui, d'après les travaux de WEINBERG (159) inbibe les germes Gram + à des concentrations aussi basses que 0, 001 pour cent et les Gram - à des concentrations dépassant 0, 05 pour cent ; seul Escherichia coli, sensible à une concentration plus élevée de chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium, poussera sur ce milieu. Or, dans l'air, la présence des Coliformes semble assez rare et la boîte de Pétri devra donc rester stérile après avoir été ensemencée avec le liquide de prélèvement.

Les premiers essais d'analyse d'air ambiant réalisés au laboratoire se sont avérés stériles :

Nous avons effectué le même essai avec un temps de prélèvement de 3 heures et avons ensemencé 2 ml dans chaque boîte de Pétri ; nous avons obtenu des nombres très petits : 21 - 154 - 7 - 130 par m3.

Ces nombres sont aussi en rapport avec ceux trouvés sur la boîte de Pétri laissée ouverte durant toute la durée du prélèvement comme témoin de l'air prélevé ; mais ils sont très inférieurs à ceux relevés dans la littérature : BOURDILLON (14), entre autres, admet des quantités allant de 2000 à 4000 bactéries par m3. Cependant, nos prélèvements ont été effectués au 3e étage dans un endroit aéré et

calme et des comparaisons ne peuvent être aisément faites avec les autres travaux.

Le problème du prélèvement n'étant qu'un "à côté" de notre travail, nous nous sommes surtout consacrés à la mise en évidence rapide des bactéries déjà prélevées.

Chaque essai de prélèvement d'air étant assez long, il nous a semblé plus facile de mettre au point notre méthode sur des suspensions de germes préparées extemporanément à partir de souches fraiches (ce qui se trouvera en contradiction avec l'état normal des bactéries de l'air mais qui serait probablement réalisé dans le cas d'une agression bactérienne), et de revenir ensuite à l'étude de microbes de l'air pour vérifier la validité de la technique.

Avant tout essai, nous avons dû déterminer la dilution expérimentale qui donne une concentration correcte, c'est-à-dire la quantité de bactéries qui, après culture, permet d'obtenir un nombre de colonies aisé à évaluer.

Les premiers essais ont été réalisés avec une souche de E. coli (Samet) non pathogène se développant rapidement, à partir d'une culture sur gélose inclinée âgée de 24 heures.

Un premier tube contenant 10 ml d'eau physiologique stérile sert à préparer la suspension initiale à partir d'une anse de germes ; dans un tube contenant 9 ml d'eau stérile, on ajoute 1 ml de cette suspension ; puis on porte 1 ml de cette dilution au 1/10e dans un troisième tube avec 9 ml d'eau stérile où on atteint la dilution au 1/100e. Ensuite, on prépare 6 tubes avec 27 ml d'eau physiologique ; au premier des six, on ajoute 3 ml de la dilution au 1/100e puis on porte dans chacun des tubes suivants 3 ml de la dilution précédente, ce qui donne finalement une dilution à 10^{-8} dans le dernier tube. 12,5 ml de cette dilution sont filtrés sur une membrane Millipore placée dans un porte-filtre n° XX20 047 20 dont la capacité de filtration est de 650 ml. C'est un entonnoir en acier très pur fait d'une pièce et sans joints intérieurs ; deux petites pièces rondes en nylon à l'intérieur de la bague de fixation engagent une double hélice à la base pour arrêter le disque MF de 47 mm de diamètre avec un quart de tour de la bague de fixation, laissant une surface utile de filtration de 9,6 cm2. La membrane est déposée sur une boîte de Pétri contenant du milieu Difco Bacto-Antibiotic I (voir page 47) et celles-ci sont portées à l'étuve à + 37°C.

Après 15 heures, la lecture est impossible car il y a une trop grande quantité de colonies qui forment un tapis uniforme. Le même essai est effectué avec une concentration beaucoup plus faible de germes, en filtrant sur les membranes des dilutions allant de 10^{-9} à 10^{-15}.

Les résultats suivants ont été obtenus :

10^{-9}	concentration trop forte
10^{-10}	concentration forte
10^{-11}	32 colonies
10^{-12}	6 colonies
10^{-13}	1 colonie
10^{-14}	1 colonie
10^{-15}	1 colonie

La concentration utile semble être 10^{-11}.

Pour bien établir ce résultat, nous avons reproduit ces essais avec trois concentrations différentes : 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12} mais en ne filtrant plus que 10 ml et en déposant les membranes sur deux milieux différents pour chaque concentration :
1° - une boîte avec du milieu Difco Bacto-Antibiotic I ;
2° - une boîte avec du milieu Difco Bacto-Antibiotic I auquel nous avons ajouté 1 ml d'une solution à 0,5 pour cent de chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium donnant une concentration finale de 0,02 pour cent. En effet, d'après WEINBERG, si on utilise ce corps dans le but d'observer plus facilement des colonies de toutes sortes, une concentration finale maximale de 0,001 pour cent doit être employée. Cependant si on ne recherche que des germes Gram -, une concentration de 0,01 à 0,05 pour cent peut être utilisée. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n° 5.

Tableau n° 5

Taux de dilution de la suspension de germes	Milieu Difco "Antibiotic"	Milieu Difco "Antibiotic" + Chl. de triphényl-tétrazolium
10^{-10}	Incomptable	520 colonies
10^{-11}	432	65 "
10^{-12}	36	8 "

La diminution du nombre des germes dans la boîte contenant du chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium, par rapport à l'autre milieu, est due à l'action inhibitrice de ce sel sur la croissance des bactéries.

Ayant déterminé la concentration utile, nous nous sommes attachée à colorer les germes en utilisant le colorant recommandé par la "Millipore Filter Corporation" pour ses techniques générales de microbiologie : le bleu de méthylène MF colorant les germes en bleu et la membrane en violet est préparé comme suit :

Solution A :	Bleu de méthylène	0, 75 g
	Glycérol	25 ml

Mélanger au mortier et ajouter 100 ml d'une solution à 5 pour cent de phénol. Filtrer à travers une membrane "Millipore" pour clarifier.

Solution B :	Fuschine basique	5 g
	Alcool à 95°C	95 ml

Laisser en contact une nuit et filtrer ensuite sur papier.

Solution C :	Solution B	10 ml
	Solution aqueuse de phénol à 5 pour cent	90 ml

Filtrer à travers une membrane "Millipore".

Solution D : ou colorant prêt à être utilisé :

Solution A	2 ml
Solution C	0, 5 ml
Eau filtrée à travers une membrane "Millipore"	10 ml

Pour colorer, nous opérons de la façon suivante : filtrer les microorganismes sur la membrane, verser ensuite la solution D sur cette membrane restée dans le porte-filtre, laisser le colorant agir 5 à 10 minutes et filtrer. Laver plusieurs fois avec de l'eau distillée, filtrée sur Millipore, jusqu'à ce que le filtrat soit incolore, ce qui demande un temps assez long. Sécher à l'air. Examiner au microscope après avoir rendu la membrane transparente en y ajoutant de l'huile de cèdre d'indice de réfraction convenable, $n = 1,515 \pm 0,001$, ce qui permet l'examen à l'objectif à l'immersion. Cette transparence s'obtient presque instantanément et peut être accélérée en posant la membrane sur une plaque chauffante ; il y a lieu de remarquer qu'il est presque impossible d'obtenir une bonne transparence si la membrane n'est pas très sèche et qu'il faudrait attendre plusieurs heures après la coloration pour procéder à un examen au microscope (RICHARDS et KRABEK (128)).

Si on filtre des suspensions aux concentrations établies ci-dessus, et qu'on examine les membranes au microscope directement après coloration, il est assez difficile de voir les germes d'E. coli qui sont en petit nombre (pas plus de deux ou trois par carré : on utilise en effet des membranes quadrillées pour faciliter la lecture ; chaque petit carré correspond à 1/100e de la surface effective de filtration d'une membrane de 47 mm de diamètre et chaque ligne est distante de la précédente de 3,08 mm). D'autre part, malgré les filtrations préliminaires du colorant, il reste toujours des impuretés qui se colorent également en entraînent des confusions ; enfin il semble qu'E. coli se colore mal et de surcroît en violet.

Nous avons alors pensé faire cultiver sur gélose les bactéries filtrées sur membrane jusqu'à ce que les colonies soient perceptibles à l'oeil ou à la loupe, mais nous nous sommes heurtés à une difficulté technique, car il est impossible de filtrer le colorant aux pressions que l'on emploie couramment. Si l'on veut tremper les membranes dans le bleu de méthylène MF, les colonies qui ne sont pas fixées se détachent et flottent à la surface du colorant. Nous avons alors pensé à un compromis qui consiste à colorer les colonies après culture mais avant qu'elles ne soient visibles à l'oeil nu : elles sont à l'état de microcolonies visibles au microscope à immersion.

Nous avons aussi employé une concentration plus forte de germes afin de rendre la recherche plus aisée et moins longue : 4 ml de suspension - quantité suffisante pour couvrir la totalité de la membrane sur 3 ou 4 mm d'épaisseur - sont filtrés sur cinq membranes. Celles-ci sont mises à l'étuve sur milieu Difco Bacto Antibiotic I pendant des temps différents et colorées ensuite. Les résultats suivants ont été obtenus, au microscope à l'objectif 3 (grossisant 120 fois) :

n° 0	Pas de culture, coloration juste après la filtration, toute la membrane est violette.	
n° 1	3 heures à l'étuve	coloration violette uniforme
n° 2	4 heures à l'étuve	1 ou 2 taches bleues tous les 2 ou 3 champs, le reste de la membrane violet.
n° 3	5 heures à l'étuve	quelques amas de E. coli bleus sur fond clair, le reste de la membrane en violet.
n° 4	6 heures à l'étuve	des amas, plus nombreux et plus gros que ci-dessus, bleus d'E. coli, le reste de la membrane est violet.
n° 5	7 heures à l'étuve	tout le fond de la membrane est bleu, on voit de très nombreux germes à l'état de microcolonies ou même isolés.

Cette coloration bleue intense est peut-être due à une acidification du milieu ; nous avons vérifié que par addition d'acide chlorhydrique au bleu de méthylène MF, la coloration passe du bleu foncé à un bleu très vif.

Nous avons effectué le même essai avec Sarcina lutea. Malheureusement, ce germe se développant très lentement, les résultats obtenus sont beaucoup moins nets.

Au bout de 17 heures, après filtration sur membrane, on n'aperçoit que de très rares colonies, alors qu'en 24 heures la culture est très nette ; ce développement très lent, pour que la culture soit visible sur les boîtes de Pétri témoins, se retrouve lorsque nous colorons les membranes après quelques heures d'incubation. Les résultats suivants sont trouvés en utilisant pour chaque temps de culture deux membranes sur deux milieux différents : l'un étant la gélose ordinaire, l'autre le milieu "Difco Bacto Antibiotic I". Cette précaution est inutile car les résultats sont identiques :

boîte n° 1 - temps	: 7 heures	rien
boîte n° 2 - "	: 8 heures 30	quelques rares taches bleues.
boîte n° 3 - "	: 10 heures	quelques rares taches bleues.
boîte n° 4 - "	: 11 heures 30	de gros amas bleus.

Nous avons voulu essayer notre méthode de dénombrement sur les germes de l'air : la teneur en microorganismes du laboratoire étant faible, ainsi que nous l'avons vérifié plusieurs fois auparavant, nous avons prélevé durant 3 heures avec l'appareil décrit ci-dessus. Au bout de ce temps, nous avons vidé le préleveur dans un tube stérile et nous l'avons rincé soigneusement deux fois avec 10 ml de la solution tampon utilisée déjà comme liquide collecteur dans le barboteur. Nous filtrons 4 ml de la suspension sur chaque membrane Millipore avec un débit de 4 l/mn. Chaque membrane est déposée sur une boîte de Pétri contenant du milieu Difco Bacto Antibiotic I, et le tout est porté à l'étuve. Les germes sont dénombrés chaque jour. Parallèlement, une boîte de Pétri contenant le milieu ci-dessus est laissée ouverte pendant toute la durée du prélèvement à côté du barboteur et refermée immédiatement après. Les boîtes sont laissées des temps variables à l'étuve allant de 12 à 72 heures et ensuite abandonnées à la température du laboratoire pour permettre la croissance des champignons et moisissures.

Les résultats suivants ont été obtenus :

Essai A : prélèvement dans le laboratoire (pendant que le ménage est effectué). Temps sec et assez beau (18 septembre).

Boîte n°	Temps à l'étuve	Examen après				
		24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	7 jours
1	12 h.	1	1	2	2	2
2	24 h.	4	4	4	5	5
3	36 h.	un champignon envahit toute la boîte				
4	48 h.	1	4	4	7	7
5	60 h.	1	11	14	14	envahie
6	72 h.	0	3	3	3	3
témoin	7 jours	46	58	70	77	82

Essai B : prélèvement dans l'escalier conduisant au laboratoire. Temps sec (20 septembre).

Boîte n°	Temps à l'étuve	Examen après				
		24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	7 jours
1	12 h.	0	0	0	0	0
2	24 h.	1	1	1	1	1
3	36 h.	1	1	1	8	8
4	48 h.	0	3	3	3	3
5	60 h.	1	2	2	2	2
6	72 h.	0	1	1	3	3
témoin	7 jours	25	31	35	36	40

Essai C : prélèvement dans le laboratoire. Temps sec (19 septembre)

Boîte N°	Temps à l'étuve	Examen après				
		24 h.	48 h.	72 h.	96 h	7 jours
1	12 h.	0	0	0	0	0
2	24 h.	1	1	1	1	1
3	36 h.	1	3	3	10	10
4	48 h.	1	envahie			
5	60 h.	0	4	12	envahie	
6	72 h.	0	2	3	3	3
témoin	7 jours	7	10	12	14	19

Dans chaque essai, nous avons en plus coloré deux membranes, avec le bleu de méthylène MF. La même suspension de germes était employée, la même quantité filtrée mais les temps de culture étaient différents : 14 h. et 24 h. La technique de coloration était celle décrite ci-dessus. La membrane était alors séchée, découpée de telle façon qu'elle puisse être placée sur une lame de verre, et maintenue en place par deux bandes, parallèles à la longueur, de cellophane adhésive (Scotch). Une goutte d'huile de cèdre fraîche était alors déposée au centre de la membrane afin de la rendre transparente pour l'examen à l'objectif à immersion. Chaque carré de la membrane quadrillée correspond à 1/100e de la surface totale de la membrane.

Les résultats suivants sont obtenus en comptant cinq carreaux à différents endroits car la répartition du liquide à filtrer se fait assez régulièrement (Tableau n° 6).

TABLEAU N° 6

N° de l'essai	Durée de culture à +37°C	Résultats des 5 carreaux 1	2	3	4	5	Total	Moyenne
A	14 h.	2	3	3	1	4	13	2,6
	24 h.	3	5	4	4	3	19	3,8
B	14 h.	2	3	2	4	1	12	2,4
	24 h.	2	4	5	2	3	16	3,2
C	14 h.	2	2	3	1	1	9	1,8
	24 h.	2	1	2	3	3	11	2,2

De ces résultats, nous pouvons calculer le nombre de bactéries par m3 d'air prélevé.

Pour l'essai A, le temps réel de prélèvement a été de 2 heures à un débit-minute de 4 litres, ce qui donne un volume total d'air analysé de 480 litres soit 0,48 m3. La dilution du liquide de prélèvement a été de 4 ml sur un total de 24 ml. Un nombre x de bactéries a été retrouvé sur chaque carré de la membrane soit 1/100e de membrane. Le nombre de bactéries par m3 est

$$N = \frac{X \times 100 \times 24}{4 \times 0,48} = 1250\ X$$

pour $X = 2,6$ $N = 3250$
et pour $X = 3,8$ $N = 4750$
bactéries par m3 d'air prélevé.

Pour l'essai B, le temps de prélèvement a été de 2 h 30 à 4 l/mn ce qui donne 600 litres d'air analysé ou 0, 6 m3. Le liquide collecteur a été dilué à 30 ml ce qui donne :

$$N = \frac{X \times 100 \times 30}{4 \times 0,60} = 1250\ X$$

pour X = 2, 4 N = 3000
et pour X = 3, 2 N = 4000

soit 3000 bactéries par m3 pour 14 heures de culture
et 4000 bactéries par m3 pour 24 " "

Pour l'essai C les conditions étant identiques à l'essai B, les résultats suivants sont obtenus

X = 1, 8 N = 1, 8 x 1250 = 2250 bactéries par m3 pour 14 h de culture
X = 2. 2 N = 2, 2 x 1250 = 2250 bactéries par m3 pour 24 h

De nouveaux essais ont été réalisés sur le même principe, mais en diminuant les temps d'incubation.

Essai D (25 septembre)

Boîte n°	Temps à l'étuve	Examen après			
		24 h.	48 h.	7 jours	8 jours
1	15 h.	1	1	1	1
2	24 h.	0	0	0	0
3	30 h.	0	3	3	3
témoin		9	14	16	16
boîte ensemencée directement avec le liquide collecteur.		0	2	4	5

La durée du prélèvement était de 2 h.

Essai E (27 septembre)

Boîte n°	Temps à l'étuve	Examen après			
		24 h.	6 j.	7 j.	8 j.
1	12 h.	2	2	2	2
2	24 h.	4	4	4	4
3	30 h.	7	14	14	14
témoin		16	22	22	22
boîte ensemencée avec le liquide collecteur		8	34	34	34

Essai F (28 septembre)

Boîte n°	Temps à l'étuve	Examen après			
		4 j.	5 j.	6 j.	7 j.
1	12 h.	1	1	1	1
2	24 h.	2	2	2	2
témoin		32	34	34	34
Boîte ensemencée avec le liquide collecteur		8	8	8	8

Des trois essais ci-dessus, il ressort que dans les locaux où le prélèvement a été effectué, la quantité de champignons présente dans l'air est très faible (l'augmentation du nombre de colonies sur les boîtes de Pétri après plusieurs jours à la température de 20° étant insignifiante la plupart du temps) et les taches bleues que nous aperçevons sur les membranes colorées examinées au microscope sont bien en rapport avec le nombre des bactéries seules de l'air.

Les colorations au bleu de méthylène MF sont effectuées sur trois membranes demeurant respectivement 15 heures, 24 heures et 30 heures à l'étuve.

Sur la membrane demeurant 30 heures à l'étuve, des microcolonies bleues sont visibles à l'objectif n° 3 et à un grossissement de 120 fois alors qu'à l'objectif n° 7, elles occupent une bonne partie du champ.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 7.

TABLEAU N° 7

N° de l'essai	Durée de séjour à + 37°C	Résultats sur chaque carreau	Total	moyenne	N. par m^3 d'air
D	14 h.				
	24 h.	5 4 1 5 5 0 2 2 1 0	25	2,5	3.125
	30 h.	6 4 3 4 3 9 3 6 2 4	44	4,4	5.500
E	15 h.	3 4 4 2 3 2 3 5 4 1	31	3,1	3.875
	24 h.	envahissement par champignon			
	30 h.	5 4 6 4 5 2 3 3 2 7	41	4,1	5.125
F	15 h.	2 3 5 3 2 2 3 1 3 1	25	2,5	3.125
	30 h.	4 3 7 3 5 4 1 2 4 4	37	3,7	4.625

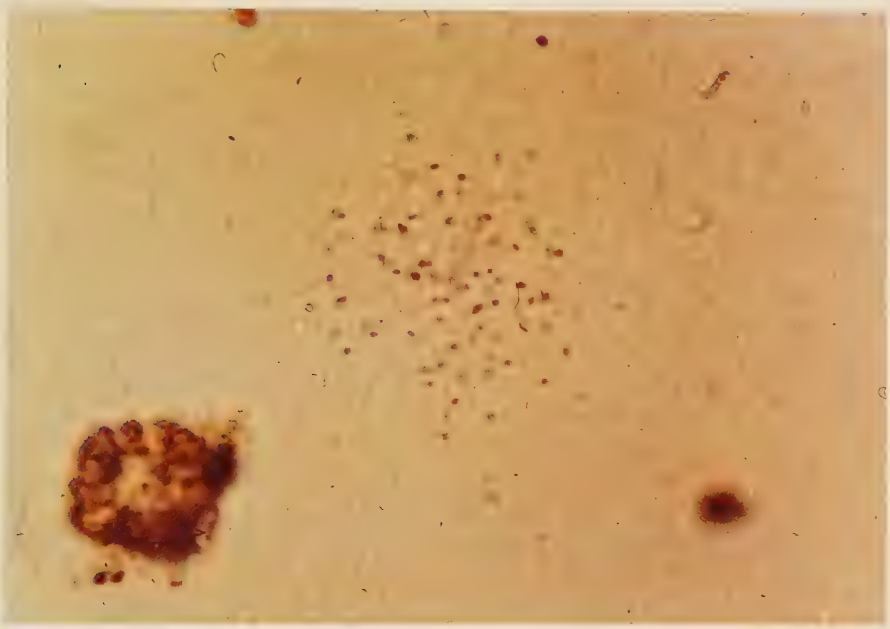
Tous ces essais personnels montrent que la teneur en germes de l'air normal n'est pas très élevé : dans le cas d'une éventuelle agression bactérienne, l'augmentation du nombre de bactéries serait certainement très sensible et l'observation microscopique de ces germes après capture, filtration sur une membrane Millipore et coloration au bleu de méthylène MF facile et rapide du fait du grand nombre de germes rencontrés dans chaque champ du microscope à l'objectif à immersion ; mais dans le cas général d'une surveillance continue de l'atmosphère, cet examen, en raison du petit nombre de microorganismes, devient très long et très fastidieux d'autant plus que de nombreuses impuretés prennent à la coloration des couleurs voisines du bleu.

C'est pourquoi nous avons cherche une coloration plus spécifique des bactéries vivantes. Nous avons pensé à un réactif de l'activité déshydrogénasique des microorganismes, le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium. W. DOLL (35), dans une publication récente, a rappelé les avantages de ce colorant ainsi que ceux des membranes filtrantes pour la numération des germes et il proposait, après culture sur membranes suivant les méthodes habituelles, de placer celles-ci sur un milieu gélosé à pH = 7, 6 contenant 0, 1 pour cent de chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium après l'avoir réchauffé à 37°C. Sur ce milieu, les colonies bactériennes se colorent en quelques minutes à la température du laboratoire par réduction du chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium en formazan rouge, sans coloration simultanée du filtre. Même la numération de très petites colonies sera sensiblement facilitée grâce au contraste qui existe entre les colonies rouges et la membrane blanche. Les reproductions photographiques sont également très faciles car les colonies rouges deviennent des points noirs, foncés au positif, par rapport au négatif ordinaire orthochromatique, insensible au rouge. Il est à noter que les colonies rouges sont composées exclusivement de microorganismes vivants ; trois heures après coloration, il est possible, si la membrane a été placée dans un endroit humide à 37°C, de repiquer les germes sur un milieu convenable, ce qui a été réalisé pour Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Corny bactérium sp. et certains Micrococcus du groupe catarrhalis.

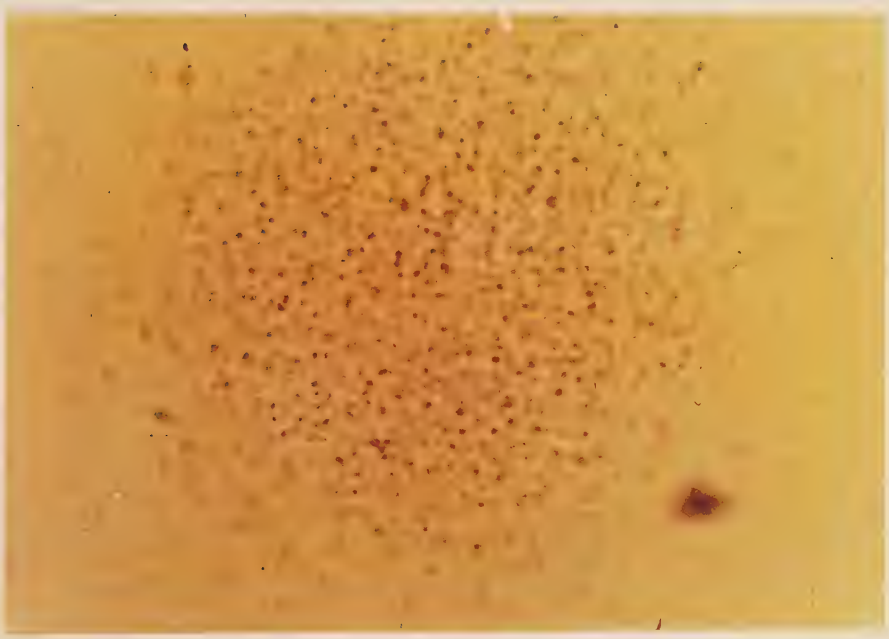
Par contre, les bactéries ne sont plus vivantes sur la membrane filtrante après 24 h de séchage à la température ordinaire. Les colonies rouges sur la membrane conservent au moins trois semaines cette coloration.

Avant d'exposer nos travaux personnels sur la modification de la méthode de W. DOLL, nous voulons rappeler quelques notions essentielles sur les déshydrogénases en général et sur les déshydrogénases bactériennes en particulier. Ensuite, nous nous sommes efforcés de rassembler une vue d'ensemble sur le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium tant du point de vue chimique que du point de vue biologique.

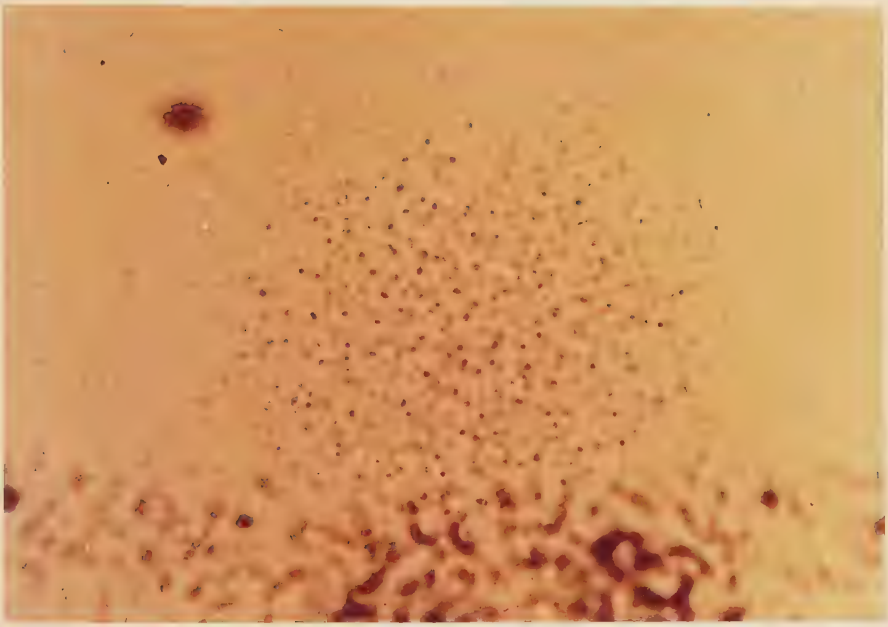
Microphotographies de colonies de Colibacille révélées sur membrane Millipore par coloration au chlorure de 2.3.5. triphényltétrazolium (grossissement 1.250).



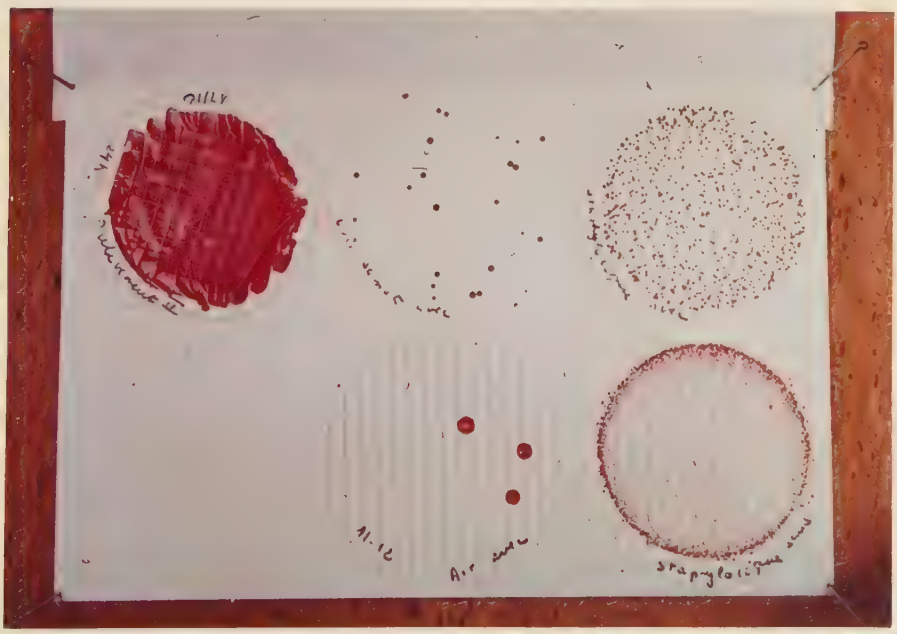
1° Culture après trois heures ; à gauche une impureté.



2° Culture après quatre heures.



3° Culture après quatre heures ; le réseau quadrillé de la membrane apparaît à la partie inférieure de la photo.



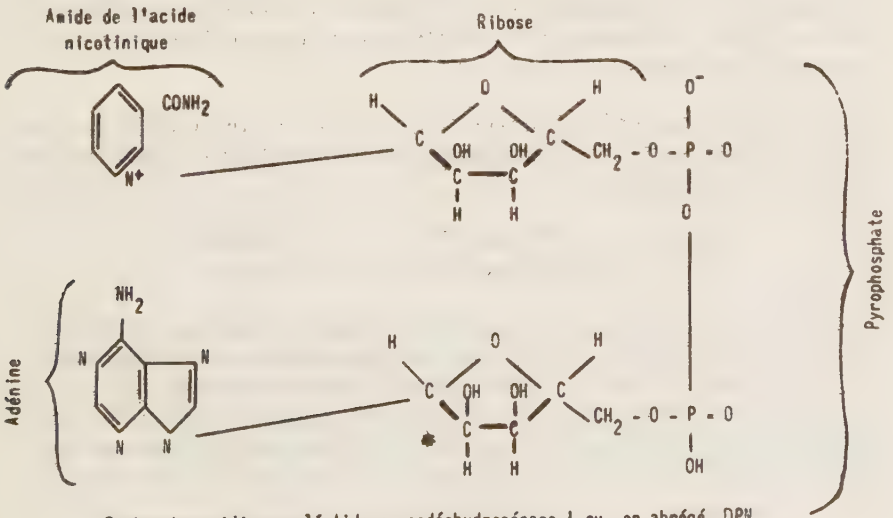
Aspect macroscopique sur membrane Millipore des colonies isolées de Staphylocoque et de Colibacille, révélées au chlorure de 2,3,5, triphényltétrazolium.

CHAPITRE III

LES DESHYDROGENASES.

Les déshydrogénases sont des enzymes catalysant un transfert d'hydrogène à un accepteur autre que l'oxygène. Elles sont à la base des réactions d'oxydo-réduction qui, par leur progressivité, ne lèsent pas la cellule vivante par une trop grande libération d'énergie à chaque stade.

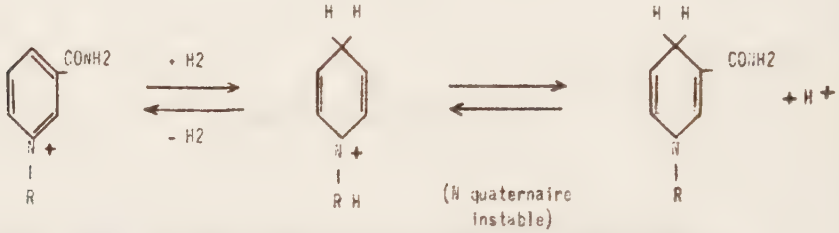
Elles furent découvertes en 1897 par les frères BUCHNER (20) qui obtinrent une fermentation alcoolique avec des jus d'extrait de levure : par purification, HARDEN et YOUNG (60) trouvèrent deux fractions, inactives séparément, dont l'une thermo-stable, dialysable, fut appelée coenzyme ou cozymase et l'autre, thermolabile, non dialysable, apoenzyme ou apozymase. La cozymase a été reconnue par von EULER et MYRBECK (43) comme un dinucléotide un peu particulier dont une des bases azotées a été identifiée à l'amide de l'acide nicotinique ou vitamine PP.



Diphosphopyridine-nucléotide ou codéshydrogénase I ou, en abrégé, DPN.

En 1932, O. WARBURG (154) a trouvé dans les globules rouges de cheval un coenzyme de déshydrogénation voisin, la codéshydrogénase II ou triphosphopyridine nucléotide (TPN) où un acide phosphorique supplémentaire est fixé sur le carbone 2 du ribose en*

De cette grande molécule, seul le noyau pyridinique est réactif selon l'équation suivante (30).



En effet, l'azote relié au ribose est quaternaire. Au cours des oxydations biologiques, il y a fixation de deux atomes d'hydrogène, l'un sur l'azote, l'autre sur le C_4 d'où disparition d'une des doubles liaisons et le réarrangement des deux autres pour conduire à une structure O-quinonique. A ce moment, la liaison hydrogène-azote devient instable et l'azote quaternaire redevient tertiaire et perd sa charge.

On obtient schématiquement :

$$DPN^+ + 2\,H \rightleftharpoons DPNH + H^+$$

(Co I) (Co I réduit)

On peut suivre cette réaction au spectrophotomètre, le diphosphopyridine-nucléotide ayant un maximum d'absorption dans l'ultra violet à 260 m μ et le diphosphopyridine-nucléotide réduit un deuxième maximum à 340 m μ.

Ce coenzyme fait souvent partie d'une suite de réactions en chaîne où on trouve d'abord un premier substrat AH2 et ensuite une molécule B acceptrice.

$$AH2 + DPN \rightleftharpoons A + DPNH2$$
$$B + DPNH2 \rightleftharpoons BH2 + DPN$$

B est souvent une alloxazine-protéine. Quant au diphosphopyridine-nucléotide, il peut se combiner à plusieurs apoenzymes distincts dans la même cellule. Le triphosphopyridine-nucléotide fait partie d'un nombre beaucoup plus restreint d'enzymes qui réalisent une quantité limitée de réactions et sont souvent aux premiers stades d'une phase métabolique.

Suivant l'un ou l'autre coferment, on peut réaliser de nombreuses réactions, en particulier pour le diphosphopyridine-nucléotide, celles qui déshydrogènent un alcool primaire en aldéhyde ou un alcool secondaire en cétone, comme le montre le tableau n° 8 de SCHAPIRA (138).

TABLEAU N° 8

Substrat réduit	Substrat oxydé	Coenzyme	Enzyme	Réaction calysée
Phosphoglyceral-déhyde	Ac. phospho-glycérique	D.P.N.	Phosphoglycéraldé-hyde-déshydrogénase (enz. oxydant)	CHO ⟶ COOH
Ac. glutamique	Ac. α céto-glutarique	D.P.N.	glutamino-déshydro-génase	HC NH_2 ⟶ CO
Ac. lactique	Ac. pyruvi-que	D.P.N.	lactico-déshydro-génase	CHO H ⟶ CO
Ac. malique	Ac. oxala-cétique	D.P.N.	malico-déshydro-génase	CHO H ⟶ CO
Ac. glucose-6 - PO_4	Ac. phospho-6-gluconique	T.P.N.	glucose-6-PO_4-déshydrogénase	CHO H ⟶ CO
Ac. isocitri-que	Ac. oxalo-succinique	T.P.N.	Isocitrico-dés-hydrogénase	CHO H ⟶ CO
Alcool éthy-lique	Ald. éthyli-que	D.P.N.	Alcoolo-déshy-drogénase	CH_2OH ⟶ CHO

Chez les bactéries, on distingue deux sortes d'enzymes :

- le exoenzymes, extra-cellulaires, chargées de scinder les grosses molécules pour permettre leur utilisation et leur pénétration dans la bactérie :

- les endoenzymes, difficiles à localiser dans la cellule.

Deux théories sont proposées, qui semblent être valables conjointement. Ces enzymes se tiendraient :

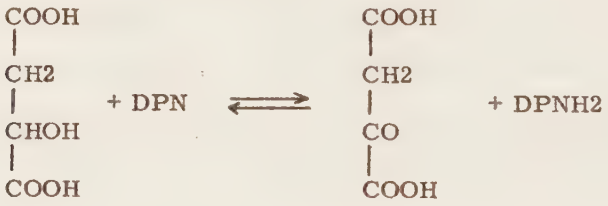
- Soit dans la membrane cytoplasmique (on le confirme en les retrouvant dans le broyat) où l'on pense qu'une double couche monomolé - culaire de lipides et de protéines permettrait par leur présence le

rôle de liaison entre l'intérieur et l'extérieur de cette membrane. On a pu ainsi isoler entre autre la déshydrogénase-6-phosphogluconique, grâce aux travaux de MITCHELL (97), à partir de E. coli, St. aureus, Sarcina lutea, B. megaterium.

- Soit, suivant la thèse de MUDD et Coll. (102, 103, 104), dans l'appareil mitochondrial. Ces auteurs ont pu les mettre en évidence en observant la réduction des sels de tétrazolium qui s'effectue en granules colorés distincts dans la masse.

De nombreuses déshydrogénases se retrouvent chez les bactéries : les malico-déshydrogénases,
. les lactico-déshydrogénases,
. la 3 phosphoglyceraldéhyde-déshydrogénase dont le coenzyme est le diphosphopyridine-nucléotide,
. la glutamino-déshydrogénase du type triphosphopyridine-nucléotide, auxquelles on ajoute les déshydrogénases liées au cytochrome et dont le transporteur d'H2 est inconnu (ex. succino- déshydrogénase et formico-déshydrogénase d'E. coli, lactico-déshydrogénase de N. gonorrhoae).

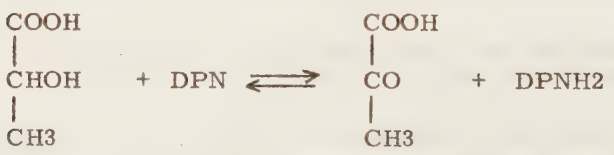
La malico-déshydrogénase a été découverte en 1910 à la fois par BATTELLI et STERN (6) et par THUNBERG (148). Elle réalise la transformation réversible de l'acide malique en acide oxaloacétique dans le cycle tricarboxylique de Krebs, en utilisant comme coenzyme le diphosphopyridine-nucléotide.



ac. malique ac. oxaloacétique

La lactico-déshydrogénase fut découverte en 1919 dans le muscle par MEYERHOF (92).

On observe la réaction suivante :



ac. lactique ac. pyruvique

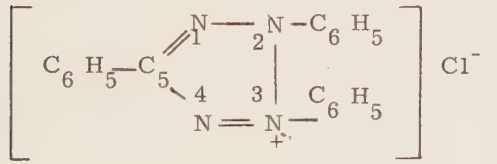
Si on veut substituer le triphosphopyridine-nucléotide au diphosphopyridine-nucléotide, les réactions sont beaucoup plus spécifiques et n'ont pas toujours lieu.

oOo

CHAPITRE IV.

LE CHLORURE DE TRIPHENYL 2. 3. 5. TETRAZOLIUM : SES PROPRIETES CHIMIQUES, SON EMPLOI EN BIOLOGIE.

Le chlorure de triphényl-2. 3. 5. - tétrazolium a pour formule :



$C_{19} H_{15} N_4 Cl = 334,82$

C : 68, 16 % ; H : 4, 52 % ; N : 16, 73 % ; Cl : 10, 59 %

Il fut découvert en 1894 par VON PECHMAN et RUNGE (116) alors qu'ils procédaient à l'oxydation de divers formazans.

VON PECHMAN (114) avait décrit dès 1892, comme une règle générale, la préparation de formazan à partir d'une molécule d'acide malonique et de deux molécules de phényldiazonium agissant successivement. En 1894, VON PECHMAN (115) reprit les différentes méthodes conduisant au formazan. De même BAMBERGER (4) obtint ce même corps à partir de la benzoamidoxime et de la phényl hydrazine.

Ensuite, par oxydation du formazan avec l'oxyde de mercure ou le nitrite d'amyle, on obtient le chlorure de triphényl - 2. 3. 5. - tétrazolium.

M. ROMENS - HOMAIRE (130) a étudié les détails de cette préparation.

Malheureusement, les sels préparés par cette méthode se révèlèrent difficiles à purifier. Aussi, en 1941, KUHN et JERCHEL (74) s'intéressant aux propriétés bactéricides des dérivés azoïques

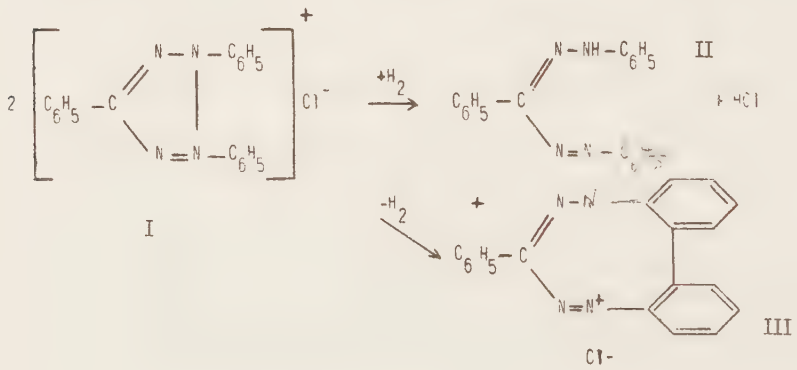
et remarquant que celles-ci sont exaltées par l'augmentation du nombres d'azotes, préparèrent des séries de sels de tétrazolium en oxydant les formazans avec le tétra-acétate de plomb. Ils ont ainsi obtenu, entre autres, les sels de triphényl-2. 3. 5 - tétrazolium et en particulier le chlorure, avec un rendement de 70 à 80 pour cent en produit pur.

PROPRIETES PHYSIQUES.

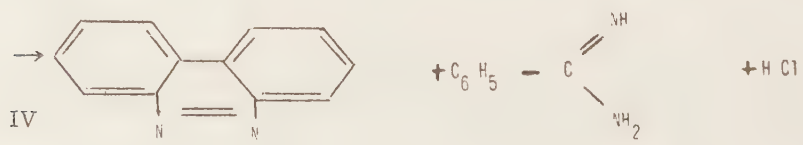
Le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium est un corps cristtalisé en longues aiguilles blanches. Il est soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, insoluble dans l'éther. Son point de fusion est 263°. Son spectre d'absorption, ainsi que celui du formazan, a été déterminé par NORDMANN et Coll. (106).

Le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium stable à l'état anhydre, ne l'est plus en solution, surtout à la lumière. (162) On doit donc le conserver à l'abri de la lumière en flacon teinté.

Il se produit une réaction photochimique d'oxydoréduction interne qui, à partir de deux molécules de chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium donne 1 molécule de triphénylformazan (II) + 1 molécule de chlorure de o. diphénylène 2. 3 phényl 5 tétrazolium (III).



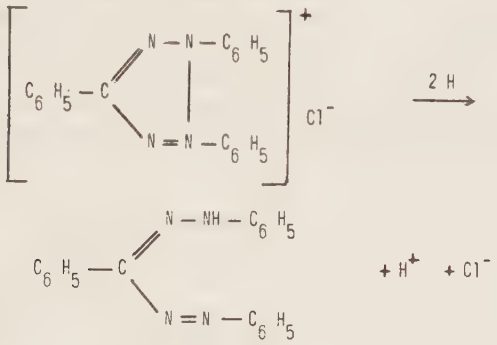
Ce corps (III), soluble dans l'eau, est presque incolore mais susceptible de se transformer par réduction en phénazan (IV), substance jaunâtre.



ce que E. WINLING (166) avait déjà remarqué en notant une teinte jaunâtre dans les solutions abandonnées à la lumière.

PROPRIETES CHIMIQUES

La principale propriété du chlorure de triphényl-2. 3. 5. - tétrazolium est sa réduction en formazan rouge. Celle-ci s'effectue de la façon suivante :



Il oxyde les cétoses et les aldoses ainsi que les α cétols qu'il permet d'ailleurs de caractériser en chimie analytique.

Cette réduction quantitative est très rapide ; elle se fait à froid ou mieux en chauffant à 37°, même en présence d'un excès de solution de ce corps.

Le formazan obtenu est insoluble dans les solvants du triphényl-tétrazolium comme l'eau et l'alcool, ce qui rend la réaction irréversible. Par contre, il se dissout dans l'actéone et sa couleur rouge intense permet de suivre aisément la réaction de réduction. Celle-ci est d'ailleurs conditionnée par le pH du milieu réactionnel. NORDMANN et coll. (106) ont montré, en utilisant un réducteur puissant, l'hydrosulfite de sodium, que le temps et la vitesse de réduction sont les mêmes lorsque le pH du milieu réactionnel est compris entre 4 et 12, 5. Dans ces conditions, la réaction est complète. Par contre, elle reste incomplète si le pH du milieu s'abaisse en dessous de 4 et devient nulle pour des pH de 2, 5 et en-dessous.

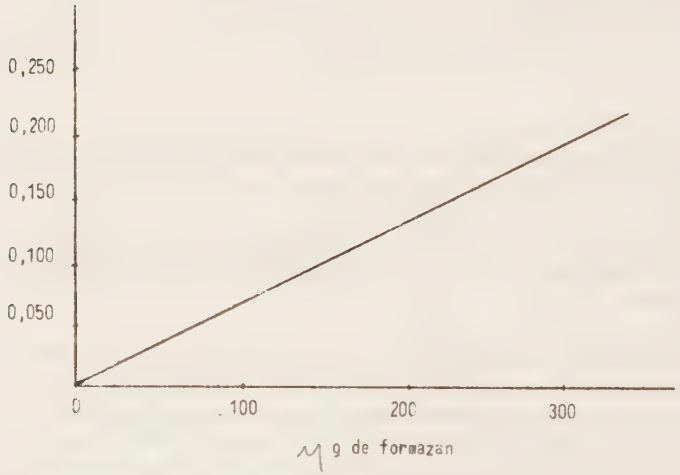
Avec les sucres (glucose, galactose) et les thiols (chlorhydrate de cystéine), la réaction se fait à froid et à pH = 9 ; mais en milieu acide ou neutre, elle est beaucoup plus difficile à amorcer. KUN et ABBOD (76) remarquèrent que des homogénats de tissus ne réduisent les sels de tétrazolium que dans des conditions très strictes d'alcalinité en l'absence de toute réaction enzymatique.

Ils mirent au point un dosage colorimétrique qui, avec quelques légères modifications, peut être applicable à toutes les réactions. Dans des tubes à centrifuger calibrés à 15 ml, on mesure :

0, 5 ml de tampon phosphate 0, 1 M (pH = 7, 4)
0, 5 ml de solution de succinate de sodium 0, 2 M
1, 0 ml d'homogénat de tissu
1, 0 ml de solution à 0, 1 pour cent de chlorure de triphényl-2. 3. 5.-tétrazolium fraichement préparée. Après agitation, les tubes sont placés dans une étuve à 38°C pendant 15 à 30 minutes. Immédiatement après avoir retiré les tubes, on ajoute 7 ml d'acétone, on agite, et on centrifuge. Le liquide surnageant sert à la détermination colorimétrique au photomètre. La coloration reste stable quelques heures. Il y a une relation linéaire entre la quantité de colorant et la densité optique, $\log \frac{I^\circ}{I}$, pour des concentrations comprises entre 20 et 300 µg. La courbe étalon est obtenue en réduisant des solutions de 20 à 300 µg. par quelques cristaux d'hydrosulfite de sodium.

$\log \frac{I_0}{I}$

Fig. N° 4



KOCHWESER, BARCLAY et EBERT (71) emploient comme solvant du formazan, l'acétate d'éthyle.

En raison de ces qualités, ce sel dont la synthèse est devenue facile depuis KUHN et JERCHEL en 1941, fit l'objet de très nombreuses recherches. En 1940, G. LAKON (77) montrait que les tissus embryonnaires vivants des graines hydrogénaient le chlorure de triphényl 2. 3. 5. - tétrazolium en formazan qui se révélait être ainsi un colorant vital.

PROPRIETES BIOCHIMIQUES

Dès 1941, KUHN et JERCHEL (75) avaient remarqué que des solutions diluées de chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium coloraient du cresson, des levures et des bactéries et ils pensaient que cette réduction du sel incolore en rouge n'était pas le fait du glutathion de l'acide ascorbique ou de la cystéine car ces substances ne réduisaient le chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium qu'à des pH supérieurs à 9 alors que ces colorations avaient lieu à un pH neutre.

En 1947, MATTSON, JENSEN et DUTCHER (86) ont vérifié la réduction du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium par des cellules vivantes à pH = 6,9, en particulier sur des quartiers de pomme et d'orange, du raisin, des champignons, des carottes, des jeunes feuilles, des pistils et des ovaires de fleurs, du sperme de taureau, du blastoderme d'oeuf de poule ainsi que du sérum de sperme de taureau et de la chalaze de blanc d'oeuf. Ils ont montré que cette réduction n'était pas due aux sucres contenus dans ces corps car un travail postérieur a montré que le formazan obtenu ici à pH = 7 ne s'obtenait en présence de sucres réducteurs qu'à pH = 11. D'ailleurs ces mêmes tissus chauffés à 82° C sont incapables ensuite de se colorer en rouge, ce qui a fait penser aux auteurs à une réduction enzymatique due à une déshydrogénase. Ils vérifient que la glucose-déshydrogénase + le coenzyme I, en présence de substat, réduit le sel à pH = 6,6.

A la même époque, COTTREL (29) emploie le chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium comme indicateur de germination des graines : seules, celles qui sont viables se colorent en rouge. WAUGHT (155) l'utilise en solution à 1 pour cent pour teinter des tiges d'arbres : érable, pommier, prunier, saule, etc... La coloration apparaît dans le cambium en 4 heures ; si on chauffe les branches auparavant, il ne se passe plus rien. STRAUSS, CHERONIS et STRAUSS (146) s'en servent comme d'un révélateur de cancer car les cellules carcinomateuses le réduisent plus vite que les cellules saines.

SCHAEFFER (137) décrit une utilisation particulière du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium dans la détermination de l'activité déshydrogenasique des sols qui permet de mesurer leur activité biologique globale : en effet, cette activité déshydrogénasique a été trouvée en corrélation avec l'intensité du métabolisme microbien dans les horizons organiques des sols mésotrophique hydromorphyques. Elle est mesurée par la réduction du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium en formazan et exprimée en humus et en concentration de sol sec. Il suffit d'ajouter à la suspension du sol à analyser, une solution à 1 pour cent de chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium et de laisser en contact 20 h à 28°C. Le formazan est alors extrait à l'acétone et sa densité optique lue au spectrophotomètre.

En bactériologie, CHAPMAN (26) avait trouvé un milieu de culture pour la numération et la différenciation des Coliformes :

extrait de levure Difco	3 g
Protéose peptone n°3	5 g
Lactose	10 g
Gélose	15 g
eau q.s.p	1 000 cc.

On ajuste à pH = 6,9 et on ajoute 0,1 ml de Tergitol 7 et 2,5 ml de sol. à 1 pour cent de bleu de bromothymol.

Les Colibacilles y formaient des colonies jaunes entourées de zones de même couleur. Les "Paracoli" ne fermentent pas le lactose du milieu et sont entourés de halos bleus. L'Aérobacter se trouve en colonies verdâtres.

En améliorant ce milieux, après les travaux de HUDDLESON et BALTZER (65) et de GOETZ et TSUNEISHI (51) qui utilisaient le chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium comme indicateur coloré des colonies en développement, CHAPMAN (27) emploie 1 litre du milieu précédent au Tergitol 7 auquel il ajoute 40 mg de chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium avant l'ensemencement des boites de Pétri. Sur ce milieu, les colonies de surface d'E. coli sont jaunes-verdâtres avec un halo jaune, tandis que les autres coliformes prennent une teinte rouge foncé que l'on peut mettre en évidence après 10 heures déjà. Par contre, en regard de la toxicité du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium, les autres bactéries sont en général imbibées, la concentration de 0,02 pour cent étant beaucoup trop élevée pour les autres germes à l'exception des Pseudomonas et de quelques Salmonellae. Les bactéries Gram + sont encore plus sensibles à cette concentration que les bactéries Gram - .

WEINBERG (159) a pu établir une courbe des concentrations maximales de chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium en regard des différents groupes de germes entre 0,0001 et 1 pour cent. Il arrive à la conclusion suivante que si on veut employer ce colorant dans le but d'observer plus facilement des colonies de toutes sortes, une concentration finale maximale de 0,001 pour cent doit être employée. Cependant, si on ne recherche que des bactéries Gram - comme dans l'étude des eaux contaminées, on peut utiliser une concentration de 0,01 à 0,05 pour cent.

Nous avons nous-même vérifié ces expériences en utilisant le milieu Difco au "Tergitol 7" et en ajoutant extemporanément et stérilement le colorant en solution à la concentration de 0,02 pour cent. Nous avons obtenu le tableau n°9 : (ceci pour les Coliformes).

Le chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium est aussi employé dans le dosage de la vitamine B 12 où il devient un révélateur de la culture de E. coli 113-3 à la concentration de 0,125 pour cent. (78).

oOo

	10 h.		24 h. Coloration			48 h.
		Culture	Colonies	fond	halo	
Coli 89	0	++	jaune marron	bleu	0	Colonies marron pâle, halo bleu, fond bleu
Coli 111 B_3	+	+++	jaune orangé	jaune orangé	jaune	id.
Coli 111 B_4	0	+	"	"	"	id.
Coli 55 B_5	+	++	orangé	jaune	"	id.
Coli Samet	++	+++	jaune orangé	"	"	id.
Coli 26 B_6	+	+++	"	"	"	id.
Citrobacter	0	++	rouge sang	"	0	vert avec halo marron rouge, fond bleu.
Aerobacter	0	++	"	"	jaune	id.
Klebsiella	++	+++	rouge	jaune puis redevient vert.	0	id.
A Cloaca	0	+++	marron vert	bleu	0	id.
Dispar	0	+++	"	"	0	id.
Coli 113-3	0	+++	jaune orangé	jaune orangé	0	
Coli X. Para-Coli.	0	+++	marron vert	bleu	0	

TABLEAU N° 9

CHAPITRE V

JUSTIFICATION DE L'EMPLOI DE L'ACIDE GLUTAMIQUE ET DU GLUCOSE DANS LA METHODE PROPOSEE

Notre technique de prélèvement et de dénombrement des germes de l'air après microculture sur membrane devait pouvoir profiter des avantages de ce colorant. Au lieu d'examiner les microcolonies à l'oeil nu ou à la loupe, il devenait possible de les mettre en évidence au microscope à l'objectif à immersion, après quelques heures d'étuve seulement, alors qu'elles commencent tout juste à se développer. En effet, le colorant étant incolore, il n'a aucune action sur la membrane qui ne présente en elle-même aucune propriété réductrice. De plus, la couleur rouge est beaucoup plus facile à distinguer que la bleue et l'examen systématique moins pénible; enfin et surtout, cette coloration ayant l'avantage d'être vitale, seuls les germes vivants et capables de se multiplier sont comptés. Ceci élimine de nombreux germes qui peuvent se trouver dans l'air dans un état de vie très ralentie et qui, au contact de milieux de culture trop riches pour eux, ne sont pas capables de survivre, ayant déjà été très éprouvés par le prélèvement.

Nous avons donc appliqué cette nouvelle technique à une suspension d'Escherichia coli à la concentration optimale précédemment établie à 10^{-11}.

Sept boites de Pétri contenant un milieu Difco Bacto-Antibiotic I reçoivent chacune une membrane, au travers de laquelle 4 ml de la suspension d'Escherichia coli ont été filtrés, et sont ensuite mises à l'étuve pendant des temps variant de 1 à 6 h. Chaque membrane est alors déposée sur une boite de Pétri contenant le même milieu Bacto-Antibiotic I mais ajusté à pH = 7,6 et auquel 0,1 pour cent de chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium en solution a été ajouté au moment où le milieu était prêt à être coulé dans la boite de Pétri. La solution est préparée extemporanément en dissolvant le corps dans la solution-tampon employée pour le prélèvement; pour cela, on pèse 200 mg que l'on introduit asepti-

quement dans un tube stérile auquel on ajoute de même 10 ml de la solution tampon; la dissolution se fait très rapidement et très facilement à froid. Pour l'emploi, on ajoute stérilement 1 ml de cette solution aux 20 ml du milieu prêts à être coulés dans la boite de Pétri, ce qui nous donne bien la concentration de 0,1 pour cent cherchée. Cette solution, ainsi que la boite de Pétri contenant le chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium peut être conservée au réfrigérateur tant qu'une contamination extérieure n'est pas venue souiller sa surface.

La boite avec les membranes (on peut en effet utiliser une grande boite de Pétri sur laquelle il y aura suffisamment de place pour déposer plusieurs membranes) est alors portée à l'étuve à 37°C pendant 20 minutes environ, nous avons constaté qu'à cette température la réduction en formazan se faisait plus rapidement, ce que DOLL avait déjà remarqué. Ensuite les membranes sont montées sur les lames de verre à l'aide de ruban adhésif alors qu'elles sont encore humides, et mises à sécher plusieurs heures avant d'ajouter l'huile de cèdre et de les examiner à l'objectif à immersion. Si les membranes sont séchées en premier lieu, il devient très difficile de les fixer sur la lame car elles se déchirent très facilement au moindre contact.

Les résultats suivants ont été obtenus : (tableau n°10)

Tableau n° 10

Temps d'Incubation en heure	Objectif n°3 X 120	Objectif à immersion X 1430
1	rien	rien
2	rien	rien
3	rien	quelques microcolonies
4	rien	nombreuses microcolonies
5	rien	nombreuses microcolonies
6	rien	nombreuses microcolonies

Les premiers résultats ont peut être été faussés par une concentration trop faible en germes. Le témoin, ensemencé de la même façon et laissé à l'étuve 24 h., nous montre qu'il n'en est rien. Nous avons refait le même essai avec la même concentration d'Escherichia coli mais en prenant deux membranes pour chaque temps; la première est traitée comme ci-dessus; quant à la seconde, la réduction est effectuée en anaérobiose en plaçant la boite dans une cloche à vide car certains auteurs ont noté une réduction plus rapide du triphényl 2.3.5. tétrazolium en anaérobiose.

Pour notre part, nous n'avons pas distingué de différence sensible et avons par la suite abandonné cette technique au profit de celle décrite ci-dessus. Les résultats sont les suivants (tableau n°11) :

Tableau n° 11

Temps d'Incubation en heure.	Objectif n° 3 X 120	Objectif à immersion X 1430
1	rien	rien
2	rien	quelques microcolonies
3	rien	nombreuses microcolonies
4	rien	nombreuses microcolonies
5	rien	nombreuses microcolonies
6	rien	nombreuses microcolonies

Des essais précédents, il ressort que la lecture semble pratiquement inutile pour des temps aussi courts que 1 et 2 heures qui correspondent au temps de latence retrouvé sur les courbes de croissance au biophotomètre. Nous les avons supprimés de nos essais.

Une autre remarque s'impose : la coloration obtenue, au lieu d'être franchement rouge, est le plus souvent rosée ou même jaune pour des temps de 3 à 5 heures de culture à l'étuve. Une inattention de notre part, qui nous a fait repiquer des germes ayant séjourné 3 h. en bouillon à l'étude à 37°C dans un bouillon frais et les avoir filtrés sur membrane Millipore et colorés ensuite après 1 h. soit au total 4 h. de séjour à l'étuve, nous a permis de constater que tous les germes étaient colorés en rouge vif.

Pensant avoir affaire à une erreur, nous avons effectué à nouveau cet essai et retrouvé ce même phénomène chaque fois pour des temps de 4 ou 5 h; Il fallait donc essayer de diminuer le temps de latence qui influait sur la production des déshydrogénases pour s'efforcer d'accélerer le démarrage des germes. Un milieu neuf semblait agir comme stimulant et gagner ainsi deux ou trois heures. Le repiquage semblant une méthode peu commode, nous avons cherché à favoriser ce démarrage rapide par une modification du milieu.

Une souche de Staphylocoque doré, qui avait nécessité des délais beaucoup plus longs pour qu'une coloration soit visible à l'objectif à immersion (de 6 à 7 h.) a permis d'observer une coloration rouge très nette pour des temps de 4 à 5 heures en utilisant le phénomène que nous venons de décrire.

Pour améliorer la méthode, le point essentiel était de diminuer le temps de latence qui est celui pendant lequel les germes commencent leur croissance et par là-même augmentent leur production de déshydrogénases.

SEVAG et FORBES (139) remarquèrent que des bactéries non proliférantes de Staphylocoque doré avaient un pouvoir réducteur très limité vis à vis du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium en présence de glucose ou d'acides aminés; par contre, l'action combinée du glucose et des substances azotées augmente très sensiblement la formation du formazan. SEVAG et FORBES ont pu ainsi dresser le tableau n° 12 dans lequel l'activité déshydrogénasique des bactéries non proliférantes est évaluée au photomètre en présence de diverses substances :

Tableau n° 12

Substance ajoutée	Lecture photométrique
Bactéries seules	12
- + glucose	23
- + acide glutamique 1000µg/ml	12
- + glucose + acide glutamique 10 µg/ml	118
- + glucose + acide glutamique 100 µg/ml	234
- + histidine 1000 µg/ml	13
- + glucose + histidine	276
- + histamine 1000 µg/ml	13
- + glucose + histamine	287
- + alanine 2250 µg/ml	11
- + glucose + alanine	254
- + α Oxoglutarate 1370 µg/ml	8
- + glucose + α oxoglutarate	20
- + glucose + alanine + α oxoglutarate	24
- + glucose + acide glutamique 1000 µg/ml	292
- + glucose + acide glutamique + α oxoglutarate	11

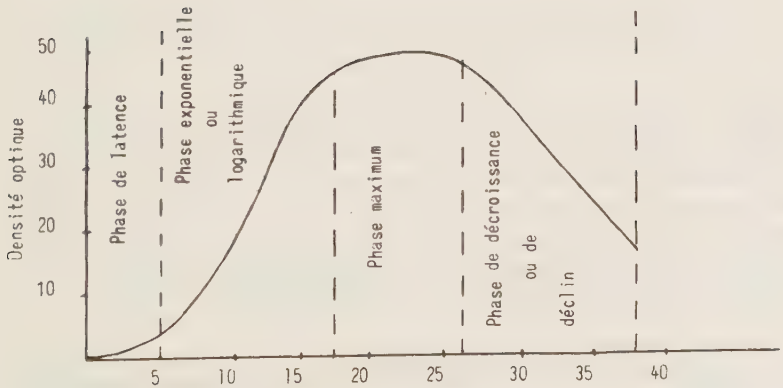
Sous les conditions de l'expérience, une quantité minimale de 100 µg/ml de glucose est nécessaire pour que l'augmentation de l'activité déshydrogénasique se manifeste.

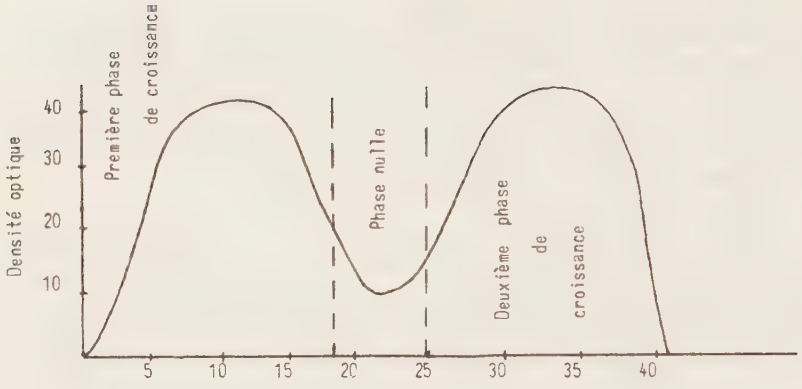
Le tableau ci-dessus nous montre que les meilleurs résultats sont donnée par l'histidine, l'histamine et surtout par l'acide glutamique à la concentration de 1000 µg/ml et à un degré moindre, par l'alanine et l'acide glutamique à 100 µg/ml en présence de glucose. Par contre, le glucose seul a une action productrice de déshydrogénases plus nette que l'acide glutamique à 1000 µg/ml seul : ce dernier donne une lecture photométrique de 12 contre 23 au glucose.

L'emploi du glucose comme accélérateur de croissance a été étudié depuis très longtemps. MONOD (100) a décrit un phénomène particulier qu'il a dénommé diauxie et qui est caractérisé par deux poussées successives de croissance séparées par une phase nulle plus ou moins longue. Ce phénomène est lié à la présence dans le milieu d'un certain couple de glucides : sucres du groupe A associés au glucose donnant le phénomène et sucres du groupe B ne le provoquant pas. Les sucres A sont toujours assimilés dans les mélanges avant les sucres B, cette diauxie exprimerait une variation du pouvoir enzymatique au cours de la croissance et pourrait s'expliquer par un phénomène d'adaptation, les sucres A étant assimilés par des enzymes constitutifs et les sucres B par des enzymes adaptatifs.

FIGURE N° 4

A) - Courbe de la croissance microbienne





B) Courbe de diauxie.

D'après cette théorie, le glucose faisant partie du groupe A semble nécessaire à la croissance rapide des bactéries. On l'avait déjà employé empiriquement dans de nombreux milieux de culture, et en particulier dans les milieux solides pour anaérobies et dans les milieux pour champignons. KRONTOWSKI (72) a remarqué que les tissus peuvent utiliser une quantité de glucose plus importante que leur poids propre mais la quantité employée diminue avec l'âge du tissu (LEBENSOHN)(80). DEMUTH (34) a établi que la croissance augmente avec les concentrations croissantes de glucose, EBELING (39) a observé des croissances augmentant régulièrement dans des cultures de fibroblastes là où les concentrations en glucose sont élevées de 200 à 1150 milligrammes pour cent. A des taux plus élevés, le glucose semble inhiber les cultures et devenir toxique. Reprenant ces travaux, WILSON et ses collaborateurs (165) ont montré qu'une augmentation du taux du glucose dans le milieu entraîne une augmentation du taux d'utilisation par la culture : cette élévation déclenche une accélération des phénomènes oxydatifs d'où activité déshydrogénasique accrue (déshydrogénases spécifiques ou non). Ils montrent qu'en l'absence de glucose, les processus dégénérescents augmentent. VERNE, HEBERT et TORDET-CARIDROIT (152) ont étudié le comportement des fibroblastes d'embryons de poulets en culture vis-à-vis des sels de tétrazolium. Des fragments de myocarde prélevés sur des embryons de 7 à 9 jours et de 14 jours ont été plongés 2 à 4 h. à 37°C dans des solutions de différents sels de tétrazolium sans fixation ni lavage préalable (technique qualifiée de "supra-vitale" par OGAWA (108).

Les résultats sont très variables suivant le sel de tétrazolium utilisé et suivant le milieu de culture. Les fibroblastes cultivés en présence de plasma dilué par le liquide de Ringer ne donnent pas de

réaction avec le nitro-bleu-tétrazolium. Au contraire, avec les solutions contenant du glucose, les fibroblastes présentent des réactions intenses; le cytoplasme est parsemé de grains bleus de taille et de formes variables, toujours en dehors du noyau. Les fibroblastes cultivés sur du plasma dilué avec le glycosol contiennent des grains en plus grand nombre et ceux-ci apparaissent plus rapidement. L'addition de succinate au milieu incubateur augmente l'intensité de la réaction, mais l'activité réductrice endogène est importante et la différence entre succino-oxydase et réductase-endogène est, pour certaines cultures, impossible à établir. Morphologiquement les fibroblastes développés en l'absence ou en présence de glucose ont le même aspect après coloration au May-Grunwald-Giemsa; ainsi les auteurs pensent qu'il y a une différence dans la constitution de la chaîne respiratoire.

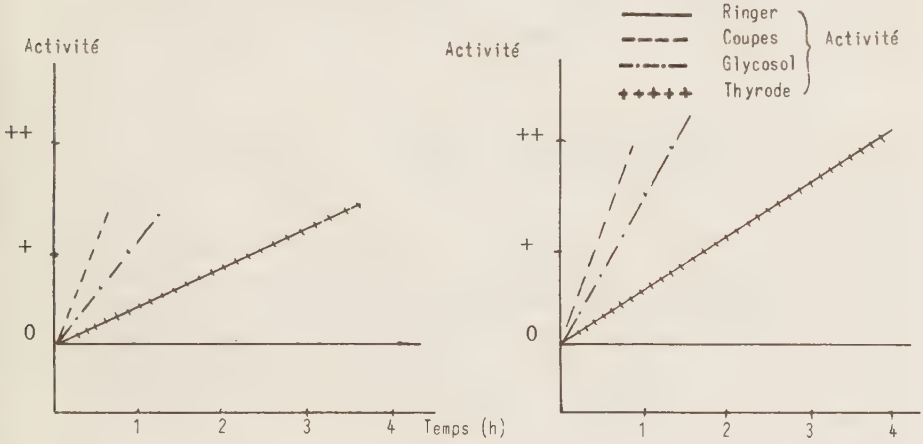


Figure 5

Sans succinate — Avec succinate

- Influence du milieu (succinate) sur l'activité des cultures de fibroblastes :

- En ordonnées : les activités tétrazolium-réductrice et succino-oxydasique (le sel utilisé est le nitro-bleu-tétrazolium)

0 : aucun grain de formazan : les fibroblastes peuvent prendre une teinte de fond brunâtre dont la signification n'est pas connue:

+ : présence de quelques grains intracellulaires,
++ : forte densité de granules, le cytoplasme contient de très nombreux grains d'une coloration bleu-violet.

- en abcisses : le temps d'incubation exprimé en heures.

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemples aussi nombreux en ce qui concerne l'acide glutamique. Seul, KOCHWESER et coll. -(71) ont rapporté avoir employé le chlorure de triphényl-2.3.5. tétrazolium comme indicateur pour des études quantitatives sur le métabolisme du bacille tuberculeux en milieu de Dubos. Ils ajoutaient à des cultures de la souche H 37 RV deux mg de sel et après 24 h., ils déterminaient la quantité de formazan produite par colorimétrie après l'avoir extrait par l'acétate d'éthyle. La quantité de formazan était directement proportionnelle au nombre de germes du milieu et un excès d'asparagine ajouté au milieu augmentait de façon notable la réduction du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium.

L'acide glutamique que nous utilisons provient des Etablissements Fould-Springer à Maisons-Alfort (Seine). C'est l'α amino-glutarique naturel dextrogyre de formule :

$$C_5 H_9 O_4 N$$

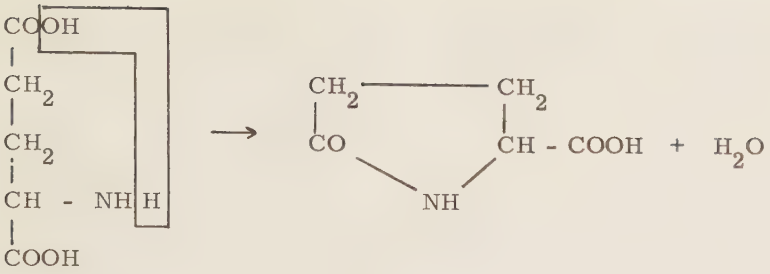
$$COOH - CH_2 - CH_2 - \underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}} - COOH$$

extrait des betteraves ou des glutens de céréales. Il se présente sous la forme de cristaux blancs scintillants, peu solubles dans l'eau (1 pour cent) solubles dans les acides et les bases diluées, insolubles dans l'alcool et les solvants organiques usuels. Son pouvoir rotatoire α D = + 12° en solution aqueuse ou dans la soude 2 N. Son point de fusion est compris entre 200 et 250°C suivant la vitesse de chauffage.

PROPRIETES CHIMIQUES :

L'acide glutamique, acide monoaminé dicarboxylique, est un acide organique relativement fort donnant des sels monobasiques, bien caractérisés avec les éléments alcalins ou alcalino-terreux. Il se transforme très facilement en une lactame, l'acide α pyrrolidone-α-monocarbonique, par élimination d'une molécule d'eau entre le groupement aminé et le groupement carboxyle le plus éloigné, en donnant un cycle penta-atomique stable. Cette transformation peut s'effectuer à sec par chauffage à des températures comprises entre 100° et le point de fusion (ce qui explique que la mesure du point de fusion ne soit pas un critère de pureté) ou en solution aqueuse.

Le produit employé a une pureté supérieure à 99,8 pour cent et doit être conservé dans un endroit frais et sec.



Ac. glutamique Ac. α pyrrolidone-α-monocarbonique

Nous avons cherché à déterminer empiriquement la concentration optimale de l'acide glutamique par une méthode rapide.

La solution d'acide glutamique à 20 mg par ml est préparée de la façon suivante : 500 mg d'acide glutamique sont dissous dans 10 ml d'eau stérile en chauffant légèrement après addition de quelques gouttes de lessive de soude; on ajoute alors 15 ml de bouillon ordinaire.

Dans un tube contenant 5 ml de bouillon ordinaire, si on ajoute 0,25 ml de cette solution, on obtient une concentration de 1000 µg par ml. (tableau n° 13)

Tableau n° 13

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8
Bouillon simple (ml.)	5	5	5	5	5	5	5	5
Sol. d'ac. glutamique à 20 mg./ml.	0,5	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01		
Sol. glucose à 30 pour cent (en gouttes)	II	II	II	II	II	II	II	.
Sup. de Staphylocoques (ml.)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Concentration en ac. glutamique µg./ml.	2.000	1.000	400	200	100	40		

Toutes les heures, on prélève dans chaque tube une goutte de mélange que l'on dépose sur un fragment de membrane Millipore placée sur la boite contenant le milieu au chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium et que l'on examine ensuite à l'objectif à immersion.

La suspension initiale en Staphylocoques étant concentrée dans le dessein de rendre la lecture facile, dès la première heure, la culture est visible mais les "temps" de 3 et 4 h. donnent les résultats plus nets : la concentration maximale de 1000 µg semble être la plus favorable : au-dessus, la croissance est rapide, mais il semble y avoir une inhibition car la taille des germes, examinée après la coloration de Gram, est beaucoup plus petite, tandis qu'au dessous de 1000 µg la croissance est plus lente : nous retrouverons ces mêmes phénomènes dans les courbes de croissance établies au biophotomètre. Après détermination de la teneur utile en acide glutamique, nous avons vérifié sur une suspension de germes (à la concentration de 10^{-11} précédemment établie) le temps minimal nécessaire pour avoir une lecture correcte au microscope dans les conditions mêmes de prélèvement de l'air. Une suspension de Staphylocoque doré à la concentration de 10^{-11} en tampon phosphaté contenant en outre 1000 µg d'acide glutamique par ml et 2 gouttes de glucose, est laissée en contact d'une demi-heure en agitant à plusieurs reprises, 4 ml sont alors filtrés sur chaque membrane et celles-ci sont placées sur les milieux Bacto-Antibiotic I Difco qui sont porté à l'étude. Après 1, 2, 3, 4 et 5 h. les membranes sont retirées de l'étuve et mises à colorer sur la gélose au chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium : deux témoins, l'un contenant du glucose seul, l'autre la suspension de germes sont mis à l'étuve en même temps. A partir de 3 heures, les germes sont visibles à l'état de microcolonies alors que pour des temps inférieurs, on ne distingue que des germes isolés qui sont ceux de la suspension initiale.

oOo

CHAPITRE VI

ETUDE AU BIOPHOTOMETRE DU ROLE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE ET DU GLUCOSE SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES.

La méthode des courbes de croissance est utilisée depuis longtemps pour étudier l'influence exercée par différents agents favorisants ou inhibiteurs sur la multiplication microbienne "in vitro". On l'utilise notamment pour le titrage microbiologique de divers facteurs de croissance et vitamines et pour l'étude du rendement des cultures en fonction des éléments nutritifs du milieu, etc... Cette méthode permet de suivre la multiplication des bactéries en fonction de l'opacité du milieu de culture liquide ; c'est un procédé optique beaucoup plus simple et rapide que ceux consistant à déterminer le poids ou le volume des germes ou à les dénombrer au microscope.

L'appareil employé est le biophotomètre enregistreur de BONEY-MAURY et JOUAN dont la description complète a été donnée récemment par DUCHENNE (38) et dont le principe est le suivant :

- Un faisceau lumineux monochromatique provenant d'une forte lampe ponctuelle est envoyé simultanément sur chacune des six cuves de culture placées dans une enceinte thermostatique : à la sortie de chaque cuve, le faisceau lumineux vient frapper une des six cellules à couche d'arrêt situées derrière les cuves.

- Un galvanomètre enregistreur à six courbes est commuté automatiquement toutes les vingt secondes d'une cellule sur la suivante : six diaphragmes placés devant chacune des cuves permettent par l'intermédiaire de six boutons molletés, le réglage indépendant de l'intensité lumineuse traversant les cuves. Ce galvanomètre enregistre sur bande de papier l'intensité du courant correspondant émis par la cellule photo-électrique. Les six cuves donnent ainsi naissance à six courbes d'absorption chacune ayant sa couleur propre.

La culture normale témoin d'un germe quelconque est enregistrée sur le papier sous la forme d'une courbe en S : on trouve une phase initiale de culture désignée sous le nom de phase de latence, une phase suivante dite logarithmique ou exponentielle correspondant

à la période de division cellulaire active.

Le retard apparent observé pour noter le départ de la courbe ne correspond à la phase de latence que pour une très petite part ; en effet, l'appareil ne donne en fait qu'un enregistrement graphique dont les ordonnées correspondent à une échelle arbitraire (nombre de divisions du galvanomètre ou pourcent de lumière transmise) et il est nécessaire d'étalonner avec des suspensions de titre connu, de telle sorte qu'une division du galvanomètre puisse être traduite en concentration bactérienne ; ceci se réalise en ensemençant les six cuves de l'appareil avec le même milieu de culture contenant 10^6 germes par ml. Lorsque l'opacité dans une cuve a atteint une division déterminée du galvanomètre, on la retire et on procède à une numération des germes à l'électrophotomètre de Meunier (BERRY, MICHAELS (8)). On voit donc, comme le fait remarquer BONET-MAURY (12, 13), que la période de latence observée par des expérimentateurs utilisant d'autres méthodes de numération que la photométrie doit correspondre au moins en partie au temps nécessaire pour atteindre, par prolifération à partir de l'ensemencement initial, le seuil de sensibilité de la méthode choisie. DUCHENNE a traduit par une courbe ce fait en inscrivant en abcisses les temps de culture et en ordonnées les logarithmes du nombre de germes par ml : si on part d'une concentration de 10^6 germes par ml (Staphylocoque doré), on ne perçoit un enregistrement sur le papier qu'après 3 heures alors que le logarithme du nombre de germes par ml croît dès le début du temps 0.

Nous avons voulu vérifier que l'addition d'acide glutamique à la concentration de 1000 μg/ml et de glucose présente bien un effet accélérateur sur la croissance des germes.

Au lieu d'employer, comme le préconise DUCHENNE, l'eau peptonée salée comme milieu de culture, nous avons préféré choisir un milieu plus proche de celui utilisé dans les boites de Pétri et nous avons pris un bouillon de même composition que la gélose Difco Bacto-Antibiotic I, c'est-à-dire :

Extrait de viande	1, 5 g.
Extrait de levure	3 g.
Peptone de caséine	4 g.
Peptone de viande	6 g.
Glucose	1 g.
Eau distillée qsp.	1000 ml

On chauffe à ébullition, filtre, ajuste à pH = 7, 4 avec de la soude et répartit en petits ballons de 80 ml environ que l'on stérilise pendant 20 minutes à 120°.

Nous avons, d'autre part, préparé une solution d'acide glutamique telle que 0, 5 ml de cette solution dans un volume total de 10 ml

corresponde à 1000µg par ml. A partir de cette solution, nous préparons les dilutions inférieures de 1000µg à 100µg. Le premier essai réalisé consiste à vérifier que deux dilutions extrêmes : 1000µg et 100µg sont suffisantes pour étudier chaque germe.

Nous employons une culture de 24 h. de Staphylocoque doré souche Oxford : nous préparons une suspension dans de l'eau stérile avec une anse de germes dont nous mesurons l'opacité au photomètre Vitatron. Il est décrit par son fabricant,* comme un colorimètre universel.

L'appareil se compose de : 1° - une partie optique ; 2° - un voltmètre à lampe ; 3° - un agitateur magnétique ; 4° - une microburette.

En combinant ces diverses parties, on peut l'utiliser pour des dosages colorimétriques ou potentiométriques.

Le principe de l'appareil est le suivant : la lumière d'une lampe à incandescence à filament de tungstène est envoyée sous la forme d'un faisceau parallèle par une lentille sur un filtre interférentiel. Une seconde lentille donne une image du filament incandescent dans l'axe d'un tube colorimétrique. Ainsi la voie lumineuse dans le tube est de même longueur pour chaque rayon lumineux. La lumière est mesurée à l'aide d'une cellule photoélectrique.

La lampe au tungstène est alimentée par un stabilisateur à transistor de grande précision. L'appareil est donc entièrement alimenté par le réseau électrique. Le boitier de la lampe assure une bonne ventilation de telle sorte que l'échantillon se trouvant dans le tube de mesure ne chauffe pratiquement pas. L'emploi de filtres interférentiels d'une bande passante de 8 à 15 mµ assure un excellent monochromatisme. L'appareil contient deux cellules photoélectriques, l'une sensible au rouge, l'autre au bleu. Le courant engendré dans la cellule est mesuré à l'aide du voltmètre à lampe. L'appareil de lecture possède une aiguille à couteau et miroir et comporte deux grandes échelles : une échelle linéaire à 100 graduations (valeurs de transmission en pourcent) et une échelle logarithmique (valeurs d'extinction de 0 à 00).

Pour les dosages colorimétriques, on utilise la partie optique en combinaison avec le voltmètre à lampe ; pour les mesures, on dispose de trois types de tubes (diamètre intérieur de 23, 17 ou 11 mm).

Le voltmètre possède un bouton de contrôle ; ainsi, lors d'une

---

* Le Comptoir Scientifique du Nord, 1 rue Saint-Etienne à Lille

série de déterminations, le blanc ne doit être introduit dans l'appareil qu'une seule fois : lors des mesures. On peut contrôler la mise au point de l'appareil au moyen de ce bouton et parfaire éventuellement le réglage sans avoir à introduire le blanc dans le photomètre. La série entière des échantillons peut donc être mesurée dans le même tube colorimétrique, ce qui augmente la précision et diminue le temps pris par ces déterminations.

Si l'on veut faire des titrages colorimétriques, on utilisera la combinaison : partie optique, agitateur magnétique, voltmètre à lampe et microburette. Des volumes très faibles sont nécessaires pour les dosages biologiques. Quant aux titrages potentiométriques, ils utilisent la même combinaison que ci-dessus mais sans la partie optique. Le pourcent de transmission que l'on obtient correspond à la concentration en germes : plus la solution est opaque, plus il y a de germes et moins il y a de transmission. Le nombre de transmission dépend aussi de la taille des bactéries car, pour deux espèces différentes, un même nombre de transmission ne correspond pas au même nombre de germes. Une courbe a été établie donnant pour le Staphylocoque la correspondance entre les chiffres trouvés au Vitatron et la numération au photomètre de Meunier.

S'il y a peu de germes, on effectue une dilution au 1/10ème dont on met 1 ml dans le ballon contenant 70 ml de bouillon.

On répartit 9 ml de cet ensemencement initial dans chacune des six cuves du biophotomètre et on ajoute 0, 5 ml de solution d'acide glutamique de concentrations différentes en respectant l'ordre des cuves :

cuve 1 correspondant à l'enregistrement bleu 100 μg/ml
cuve 2 correspondant à l'enregistrement rouge 200 μg/ml
cuve 3 correspondant à l'enregistrement vert 500 μg/ml
cuve 4 correspondant à l'enregistrement noir 800 μg/ml
cuve 5 correspondant à l'enregistrement violet 1000 μg/ml
cuve 6 correspondant à l'enregistrement marron : Témoin sans acide glutamique.

Ce premier essai avec Staphylococcus p. aureus donne un tracé des cinq premières courbes confondu, celui de la cuve n°6 étant légèrement au-dessous mais la quantité de germes est trop importante (10^{-8}) ; un nouvel essai avec une concentration plus faible de 10^{-10} a permis d'obtenir le tracé suivant : d'abord la courbe violette correspondant à 1000 μg, puis quatre courbes confondues correspondant aux quatre autres concentrations en acide glutamique, enfin la courbe témoin : on voit donc que la concentration de 1000 μg, choisie quelque peu arbitrairement, n'est nullement inhibitrice (du moins avec le Staphylocoque doré), mais qu'elle contribue à accélérer la croissance du germe d'une heure environ.

Ces expériences ont permis de limiter dans les essais suivants les concentrations en acide glutamique à deux valeurs :

1000 µg qui est celle que nous avons choisie pour la méthode préconisée ;

100 µg qui est la limite inférieure utile.

Le protocole est toujours le même du point de vue de l'ensemencement que celui décrit ci-dessus ; chaque cuve est désignée par la couleur de l'enregistrement graphique :

La cuve 1 correspond à l'enregistrement bleu : 1000 µg/ml d'acide glutamique ;

La cuve 2 correspond à l'enregistrement rouge : 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose ;

La cuve 3 correspond à l'enregistrement vert : 100 µg/ml d'acide glutamique ;

La cuve 4 correspond à l'enregistrement noir : 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose ;

La cuve 5 correspond à l'enregistrement violet : 0 + 1 pour mille de glucose ;

La cuve 6 correspond à l'enregistrement marron : Témoin 0 + 0.

1° - Staphylococcus pyogènes aureus (souche Oxford).

La dilution initiale donne une transmission de 25 au Vitatron ; on en fait une dilution au 1/10ème dont on met 1 ml dans le ballon contenant les 70 ml de bouillon pour antibiotiques : sur le tracé, on voit la courbe rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et la bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique) presque confondues, puis un écart notable d'une demi-heure au milieu de la courbe et les courbes verte (cuve 3 à 100 µg/ml d'acide glutamique), noire (cuve 4 à 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et violette (cuve 5 : glucose seul) suivant le même tracé, puis la courbe marron (cuve 6 témoin). La courbe verte (3) et la courbe noire (4) confondues au départ, se séparent à la partie supérieure du tracé où la courbe verte (3) précède la courbe noire (4) : la concentration de 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose serait donc légèrement inhibitrice alors que celle de 1000 µg/ml + 1 pour mille ne l'est pas.

Le temps de latence est ici de cinq heures alors qu'avec des concentrations plus fortes en germes, on ne trouve que des temps de deux heures. Le temps de croissance est de quatre heures.

2° - Sarcina lutea

Deux suspensions ont été utilisées : la première correspond à une transmission de 57, on en fait une dilution au 1/10ème dont on porte 1 ml dans 70 ml de bouillon : la courbe obtenue présente un temps de latence très long de quatorze heures, la Sarcine étant un germe à culture lente, l'inoculation doit être plus concentrée : d'autre part, la courbe rouge (2), à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose, semble présenter une inhibition au départ par rapport aux cinq autres mais sa montée est beaucoup plus rapide ensuite : quatre heures au lieu de huit heures pour les quatre autres et de six heures pour la violette (cuve 5 à 1 pour mille de glucose) qui rejoint dans sa partie supérieure la courbe rouge (2). La courbe en S aplatie est caractéristique de la Sarcine ; dans les germes étudiés ci-dessous, nous ne la retrouvons pas. Dans le deuxième essai, la dilution initiale donnant une transmission de 47, nous avons pris 2 ml avec lesquels le ballon est directement ensemencé. Les courbes obtenues présentent un temps de latence plus court de onze heures ; il n'y a plus que deux courbes très aplaties : la noire (cuve 4 à 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et la verte (cuve 3 à 100 µg/ml d'acide glutamique) ; la rouge (2) et la bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique) ont un aspect normal, suivies de près - une demi-heure - par la violette (5) et la marron (cuve 6 témoin) : leur temps de croissance est de quatre heures alors que celui des courbes aplaties est de huit heures.

On peut en conclure que la concentration de 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose est favorable alors que les autres concentrations sont défavorables.

3° - Eberthella typhosa

Avec ce germe, nous obtenons une courbe présentant un temps de latence de sept heures, une croissance rapide de quatre heures et une particularité que l'on retrouve souvent : les courbes violette (cuve 5 à 1 pour mille de glucose) et marron (cuve 6 témoin) se trouvent avant les courbes verte (cuve 3 à 100 µg/ml d'acide glutamique) et noire (cuve 4 à 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) ; on a donc, dans l'ordre, les courbes rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique), puis les violette (5) et marron (6), enfin les verte (3) et noire (4), chaque groupe étant séparé du précédent par un temps d'une demi-heure. On retrouve ici ce que l'on avait déjà remarqué en culture sur boite de Pétri : l'inhibition par la concentration de 100 µg/ml.

Un deuxième essai avec un germe plus jeune (24 heures au lieu de 48 heures) donnant une transmission de 88, est dilué au 1/10ème et ensemencé dans le ballon de bouillon à raison de 1 ml dans 70 ml ; il donne une courbe identique mais beaucoup plus ramassée dont le

temps de latence est de cinq heures et la croissance de trois heures 30 ; la seule différence provient de la courbe violette (5) qui est avant la noire (4) et la verte (3), la marron (6) étant la dernière. On peut en déduire que la concentration de 1000 µg/ml d'acide glutamique est bonne tandis que celle de 100 µg/ml d'acide glutamique se montre inhibitrice ; le glucose semble être un adjuvant de croissance seul, tandis qu'il supprime en partie l'inhibition à la concentration de 100 µg/ml d'acide glutamique.

4° - Salmonella paratyphi A.

Le Vitatron donne une transmission de 77 pour la dilution initiale, dont 1 ml de la dilution au 1/10ème sert à ensemencer le bouillon. La courbe forme un S assez aplati après un temps de latence de quatre heures 30. Les courbes rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique) se détachent nettement en avant des courbes noire (cuve 4 à 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et verte (cuve 3 à 100 µg/ml d'acide glutamique) qui sont, elles, confondues : le gain de temps sur la croissance est de deux heures, la durée de croissance est de quatre heures pour les courbes rouge (2) et bleue (1) alors que ce temps est de six heures pour les courbes verte (3) et noire (4) ; la courbe marron (cuve 6 témoin) se trouve un peu en deçà des deux dernières alors que la violette (cuve 5 à 1 pour mille de glucose) les précède de peu. L'influence de l'acide glutamique à 1000 µg/ml + 1 pour mille de glucose est ici très nette alors qu'à 100 µg/ml elle n'est que faible et même légèrement inhibitrice puisque la courbe témoin correspondant au glucose seul a une action plus favorable.

5° - Salmonella paratyphi B

La transmission de 86 obtenue avec la dilution initiale du germe, oblige à la diluer au 1/10ème avant d'en porter 1 ml dans le bouillon pour antibiotiques.

L'aspect général de la courbe est assez ramassé. Seule la courbe rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) se détache en avant suivie de près par la courbe bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique) ; les quatre autres voient leur tracé confondu avec, dans la partie supérieure, la possibilité d'apercevoir la courbe violette (cuve 5 à 1 pour mille de glucose) un peu séparée des autres.

Le temps de la tence est de trois heures 30, celui de la croissance de trois heures.

Ici donc la présence de l'acide glutamique à la concentration de 1000 µg/ml ne présente aucune action inhibitrice sur la crois-

sance du germe mais accélère celle-ci légèrement ; la concentration de 100 µg/ml d'acide glutamique avec ou sans addition de glucose est sans effet ; par contre, le glucose tout seul pourrait avoir des propriétés intéressantes.

6° - Escherichia coli (Samet)

La lecture de l'opacité de la dilution initiale au Vitatron donne le nombre de 70 ; de cette suspension, on fait une dilution au 1/10ème dont on prélève 1 ml pour ensemencer les 70 ml de bouillon.

Sur les deux essais réalisés, on retrouve la même particularité ; dans ces deux courbes très ramassées, on constate au même endroit (la graduation 40 du papier enregistreur) une légère bosse qui fait varier l'orientation de la suite de la courbe en l'inclinant davantage : ceci correspond à un léger ralentissement de la croissance aux 3/5ème de la courbe. Si les six courbes sont très proches les unes des autres, on peut cependant différencier nettement en avant la courbe rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) suivie de la bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique) puis les verte (cuve 3 à 100 µg/ml d'acide glutamique) et noire (cuve 4 à 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) confondues ; enfin les marron (cuve 6 témoin) et violette (cuve 5 à 1 pour mille de glucose). Le temps de latence est court : deux heures 30 pour le premier essai, deux heures pour le deuxième ; le temps de croissance est de trois heures pour les deux. La présence de l'acide glutamique dans le milieu de culture de ce germe à croissance rapide est de peu d'intérêt, de même que celle du glucose mais elles ne sont pas inhibitrices.

7° - Klebsiella pneumoniae

Après avoir obtenu avec une dilution initiale la transmission 88, on en fait une dilution au 1/10ème dont on ensemence les 70 ml de bouillon avec 1 ml.

Les courbes présentent un aspect ramassé, seules se détachent la courbe rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et, juste derrière, la bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique), les quatre autres étant confondues ; il est cependant possible de différencier leur tracé côte à côte : noire (cuve 4 à 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose), verte (cuve 3 à 100 µg/ml d'acide glutamique), violette (cuve 5 à 1 pour mille de glucose) et noire (cuve 6 témoin). Le temps de latence est de quatre heures 30, la croissance de trois heures. La présence de l'acide glutamique à la concentration de 1000 µg/ml et du glucose à 1 pour mille est tout à fait souhaitable, même si l'accélération de croissance est faible ; par contre, la concentration de 100 µg/ml d'acide glutamique ou de glucose seul est tout à fait inutile.

8° - Serratia marcescens

La transmission est de 81 pour la dilution initiale ; on en fait une dilution au 1/10ème dont on prend 0,2 ml pour ensemencer les 70 ml de bouillon.

Le temps de latence de ce germe à culture lente est de huit heures ; quant à son temps de croissance, il est de quatre heures. Les courbes sont parallèles mais bien séparées entre elles : on trouve d'abord la courbe rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose), ensuite la violette (cuve 5 à 1 pour mille de glucose), puis la noire (cuve 4 à 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et la marron (cuve 6 témoin) confondues, enfin la verte (cuve 3 à 100 µg/ml d'acide glutamique) et en dernier lieu la bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique). L'acide glutamique semble, seul, très inhibiteur puisqu'à la concentration de 100 µg/ml, il représente l'avant-dernière courbe et qu'à la concentration de 1000 µg/ml, il représente la dernière ; par contre, l'association avec le glucose exhalte cette même croissance : avec 1000 µg/ml, la courbe rouge (2) est la première. A la concentration de 100 µg/ml, cette action est moins nette puisque les deux courbes témoins sont avant elle.

9° - Pseudomonas aeruginosa

La dilution initiale donnant une transmission de 97,2 ml servent directement à ensemencer le bouillon. Le germe employé avait malheureusement été repiqué sur gélose 48 heures auparavant, ce qui nous a donné une courbe très aplatie ayant un temps de latence élevé de dix heures. La croissance elle-même demande sept heures ; la courbe violette (cuve 5 à 1 pour mille de glucose) est la première enregistrée devant la rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et la bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique), ceci jusqu'au point 40 de la graduation du papier enregistreur, où elle est dépassée par les deux autres : une inhibition de départ due à l'acide glutamique est surmontée et la croissance est alors accélérée ; le même phénomène se reproduit avec la courbe marron (cuve 6 témoin) qui précède légèrement la courbe noire (cuve 4 à 100 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et fortement la courbe verte (cuve 3 à 100 µg/ml d'acide glutamique) : au point 50 de la graduation, la courbe noire (4) dépasse la courbe marron (6) mais la verte (3) demeure toujours la dernière.

Ici, l'inhibition due à l'acide glutamique se manifeste nettement mais à la concentration de 1000 µg/ml, elle disparait au cours de la croissance pour faire place à une accélération de la croissance ; par contre, la concentration de 100 µg/ml est beaucoup plus fortement inhibitrice et, seule, la présence du glucose peut la diminuer. Le glucose, seul, a une action très favorable surtout en début de croissance.

10° - Bacillus subtilis

Le nombre de transmission de la dilution initiale est de 87 : ce germe ayant une croissance lente, on ensemence directement le bouillon avec 2 ml sans dilution.

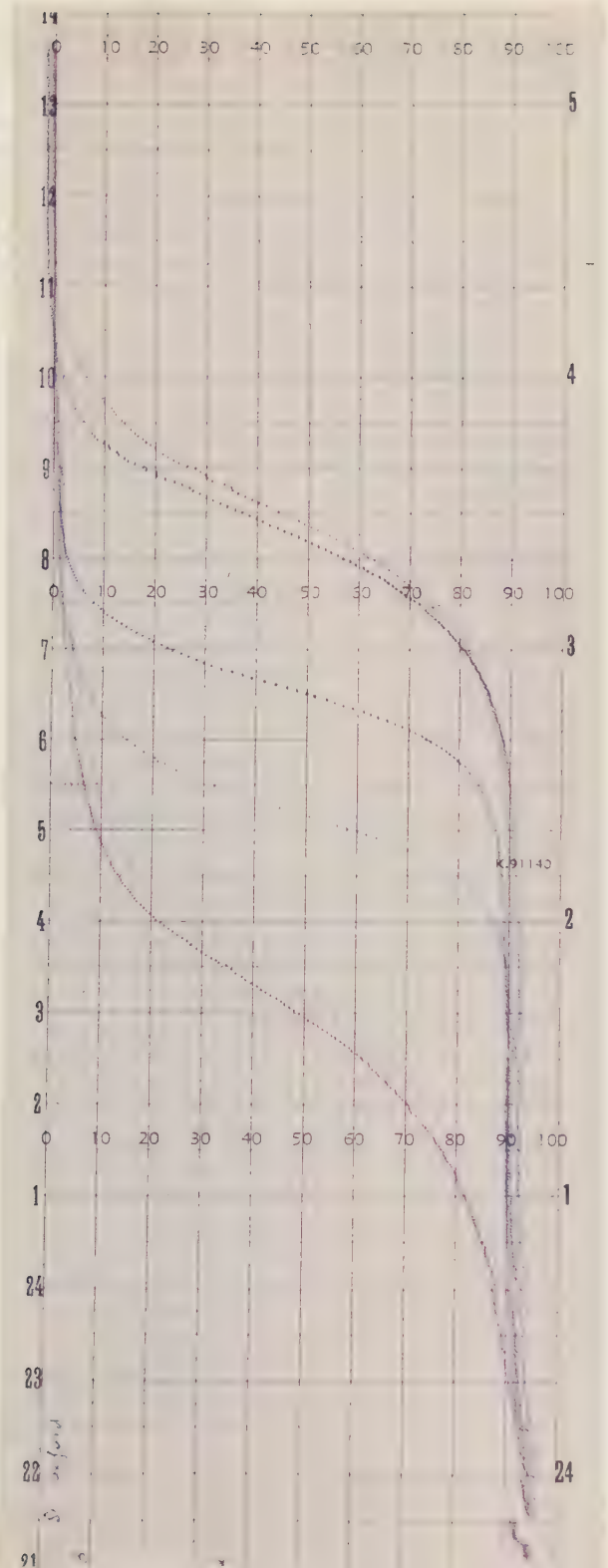
Grâce à ce grand nombre de germes, le temps de latence est de trois heures, la croissance de trois heures 30 ; les courbes sont parallèles et confondues sauf pour la rouge (cuve 2 à 1000 µg/ml d'acide glutamique + 1 pour mille de glucose) et la bleue (cuve 1 à 1000 µg/ml d'acide glutamique) qui sont légèrement en avant.

L'acide glutamique à 1000 µg/ml ne présente pas d'inhibition sur ce germe si son action sur sa croissance n'est pas très importante. Le glucose a une action négligeable.

Nous avons résumé les résultats obtenus avec les courbes sur le tableau 14 en numérotant chaque courbe de 1 à 6, le numéro 1 étant donné à la première courbe tracée sur le papier, le numéro 2 à la seconde, et ainsi de suite ; si deux ou plusieurs courbes sont confondues, elles auront le même numéro.

Tableau n°14

Germes	Rouge 1.000 µg. + Gl	Bleue 1.000 µg.	Noire 100 µg. + Gl	Verte 100 µg.	Violette Glucose	Marron Témoin
Staphylococcus pyogènes aureus	1	2	4	3	4	6
Sarcina lutea (2 essais)	2/1	3/2	4/5	3/6	1/3	4/4
Eberthella typhosa	1	2	4	5	3	6
Salmonella paratyphi A	1	2	4	4	3	6
Salmonella paratyphi B	1	2	3	3	3 +	3
Escherichia coli	1	2	3 +	3	3	3
Klebsiella pneumoniae	1	2	3	3	5	6
Bacillus subtilis	1	2	3	3	3	3 -
Pseudomonas aeruginosa	2	3	5	6	1	4
Serratia marcescens	1	6	4	5	2	3



Exemple de courbe obtenue au cours de l'enregistrement continu au biophotomètre.

Ce tableau nous montre qu'exception faite pour le bacille pyocyanique (germe âgé) et, dans certains cas, pour la sarcine (germe âgé), l'addition d'acide glutamique à la concentration de 1000 µg/ml + 1 pour mille de glucose est favorable à la croissance des germes ; déjà, dans la plupart des cas, la seule concentration de l'acide glutamique à 1000 µg est favorable puisque la courbe bleue est 7, 5 fois sur 10 la seconde, 1 fois et demie la troisième et 1 seule fois la dernière. L'action du glucose est maximale 1 fois et demie, le reste du temps elle se distingue peu des courbes contenant de l'acide glutamique à 100 µg/ml.

Courbe Rouge : acide glutamique à 1000 γg/ml + glucose à 1 pour mille — — — — —

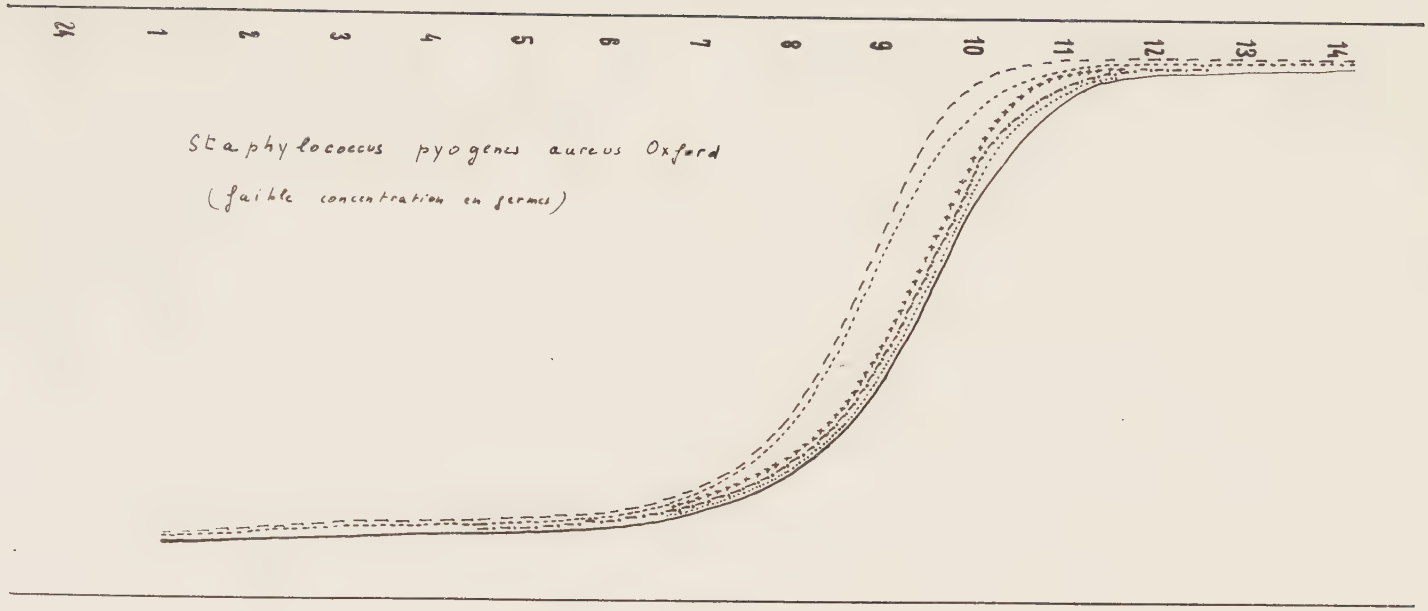
Courbe Bleue : acide glutamique à 1000 µg/ml .....

Courbe Verte : acide glutamique à 100 µg/ml + + + + + + +

Courbe Noire : acide glutamique à 100 µg/ml + glucose à 1 pour mille .....

Courbe Violette : glucose à 1 pour mille — · — · — · —

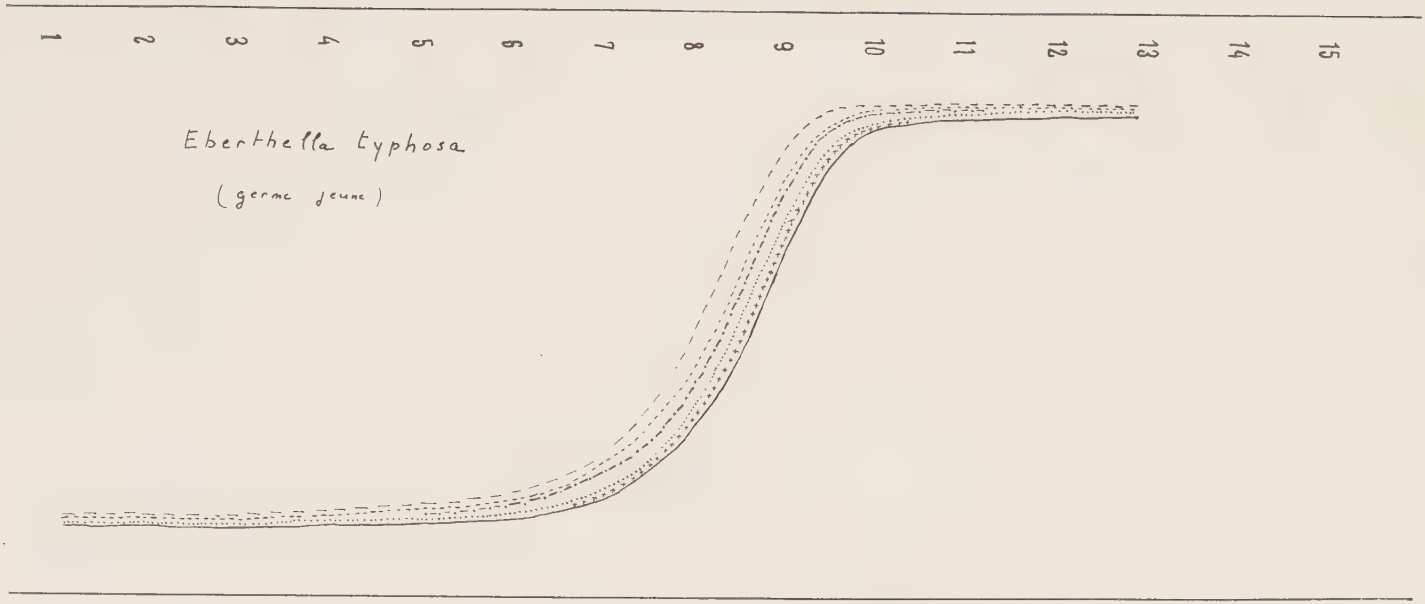
Courbe Marron : ni acide glutamique ni glucose ————

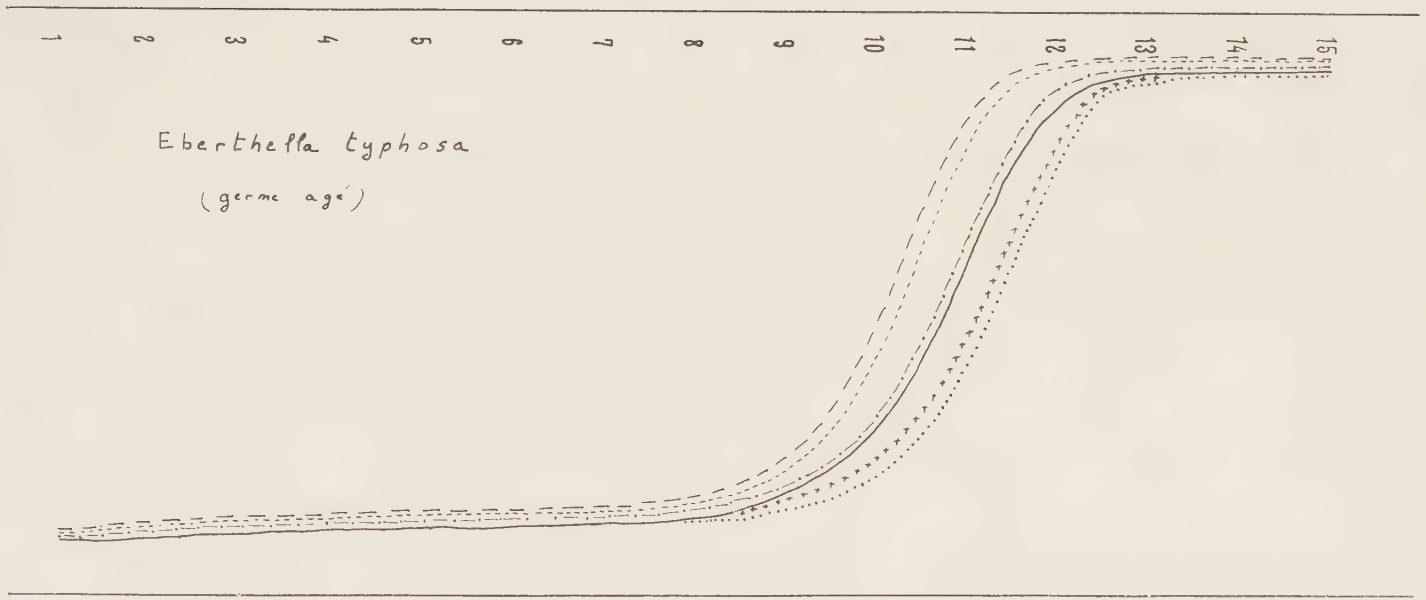

24
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Staphylococcus pyogenes aureus Oxford
(faible concentration en germes)

14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
24
Staphylococcus pyogenes aureus Oxford
(forte concentration en germes)

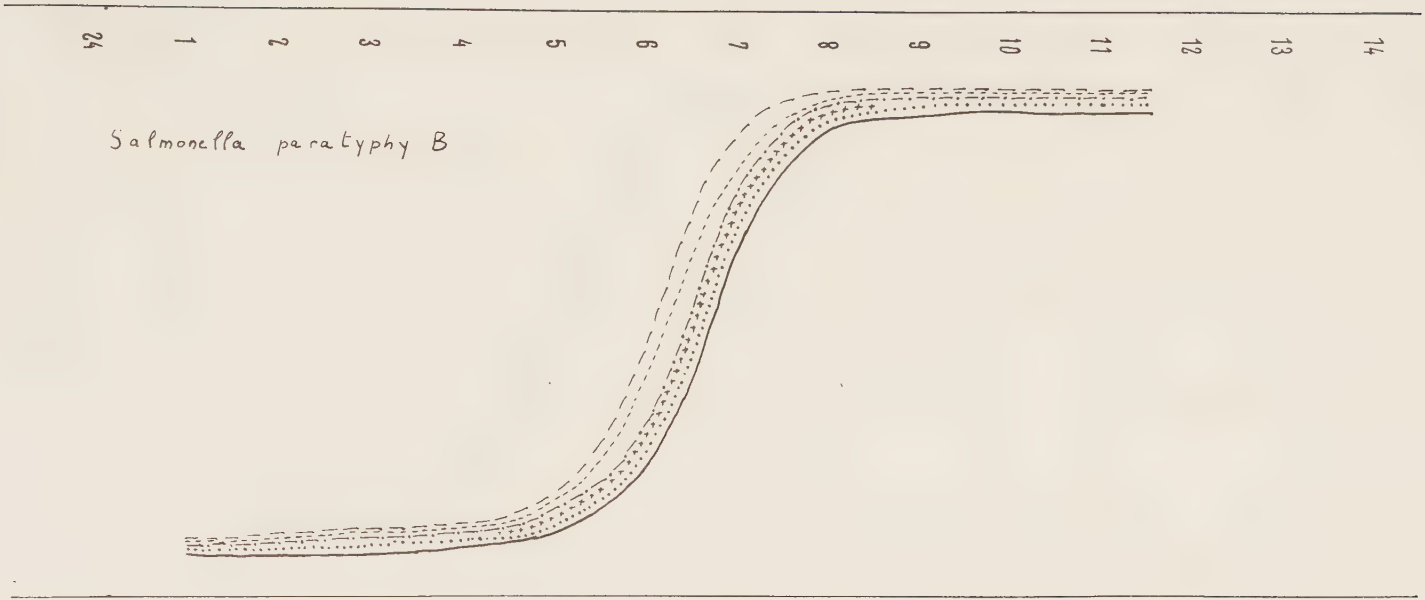
1
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
2
1
Sarcina lutea
(faible concentration en germes)

21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
2
1
Sarcina lutea
(forte concentration en germes)


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
Eberthella typhosa
(germe jeune)


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
Eberthella typhosa
(germe agé)

15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Salmonella paratyphy A


24
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Salmonella paratyphy B

13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
24
Escherichia coli (Samet)

14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
24
Klebsiella pneumoniae

15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
Serratia marcescens

22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
2
1
Pseudomonas aeruginosa

14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
24
Bacillus subtilis

TROISIEME PARTIE

ooOoo

CHAPITRE I

APPLICATION A DIFFERENTS GERMES DE LA METHODE PAR MICROCULTURE SUR MEMBRANE.

Les essais qui nous ont amenés à la mise au point de notre méthode n'ayant été réalisés que sur deux germes Staphylococcus aureus et Escherichia coli, nous avons boulu vérifier que la méthode préconisée est valable pour un plus grand nombre de germes.

Pour cela, nous avons employé une technique rapide qui nous a permis d'effectuer un grand nombre de déterminations.

Pour chaque germe, nous avons utilisé trois boites de Pétri :

- le première contenant du milieu Difco-Antibiotic I, seul,
- la seconde contenant du milieu Difco Bacto-Antibiotic I + du glucose + de l'acide glutamique à une concentration de 1000 μg/ml, partagée en deux parties par une ligne tracée dans la gélose avec une anse de platine
- la troisième contenant du milieu Difco Bacto-Antibiotic I + du glucose + de l'acide glutamique à une concentration de 100 μg/ml partagée de même en deux parties.

Les suspensions bactériennes ont été préparées de la façon suivante : dans 10 ml du tampon phosphaté employé couramment, une anse de germes était dilacérée, ceci afin d'obtenir la suspension mère. De celle-ci, 1 ml est prélevé et porté dans un deuxième tube contenant 10 ml de solution tampon phosphatée et ainsi de suite juqsu'à la dilution 10^{-6} qui fournit une concentration en germes convenable.

La suspension étant séparée en deux parties, l'une était utilisée telle quelle, l'autre recevait du glucose et de l'acide glutamique à 1000 μg/ml et était placée une demi-heure à l'étuve à + 37°C en étant agitée fréquemment (afin d'être plus voisine des conditions du prélèvement d'air).

On prélève 0,1 ml de chaque suspension dont on ensemence chaque boite de Pétri, en prenant soin de noter sur chacune le côté où

l'une et l'autre ont été déposées. Dans certains essais, la boite contenant le milieu Difco seul a aussi été partagée en deux parties ; par contre, dans le cas où cela n'était pas , la suspension utilisée était toujours celle ne contenant ni acide glutamique, ni glucose.

La lecture des résultats a été effectuée après 24 heures, on notait le nombre de germes, leur taille, le temps optimal de réduction du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium, l'intensité de cette coloration ainsi que l'aspect du liquide de la suspension bactérienne. Pour observer la réduction du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium en formazan, une parcelle de culture bactérienne est portée sur une boite de Pétri contenant du milieu Difco Bacto Antibiotic I auquel est ajouté du chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium à la concentration de 0,1 pour cent et qui est amené à pH = 7,6.

On a noté ce qui suit :

Staphylococcus pyogenes aureus (souche Oxford)

Les germes ont pu être dénombrés sur les trois boites, leur taille était identique soit 0,5 mm, leur rapidité de réduction était parmi les plus faibles, avec un léger avantage pour la boite contenant l'acide glutamique, ainsi que l'intensité de la coloration. La solution tampon contenant la suspension bactérienne portée à l'étuve, examinée après 24 heures, présentait une turbidité importante.

Eberthella typhosa

Ici les germes ne peuvent être dénombrés car ils sont trop nombreux ; toutefois, il est à noter que sur les deux boites de Pétri contenant de l'acide glutamique et du glucose, les colonies ont un diamètre plus petit que sur la gélose simple ; cette inhibition est visible aussi avec les différences de composition de la suspension :

- gélose à 1000 γ/ml d'acide glutamique, suspension sans acide glutamique : colonies plus grosses que sur le prélèvement avec acide glutamique + glucose ;
- gélose à 100 γ/ml d'acide glutamique, suspension sans acide glutamique : les colonies sont plus petites mais plus nombreuses que sur le prélèvement avec acide glutamique + glucose.

D'autre part, le temps de réduction est assez long, un peu moins pour les boites et la suspension contenant l'acide glutamique à 100 γ/ml, et la coloration accentuée pour cette dernière catégorie alors qu'elle n'est pas très prononcée pour les géloses et les suspensions à 1000 γ/ml.

Salmonella paratyphi A.

L'inhibition décrite pour le bacille typhique ne se retrouve plus ici où l'on voit que les germes prélevés et cultivés sur acide glutami-

que sont plus gros, se colorent plus vite et plus intensément que ceux cultivés ordinairement : par contre, l'inhibition se retrouve quant à la concentration de l'acide glutamique et il est à noter que 100 γ/ml semblent plus favorables pour le nombre de germes et leur taille : seule, la coloration est un peu plus faible.

Salmonella paratyphi B.

Les résultats obtenus pour ce germe sont identiques à ceux décrits pour le bacille paratyphique A, la seule différence porte sur la taille des bactéries qui est plus grande pour les germes sans acide glutamique ; la concentration de 100 γ/ml est peut être inhibitrice pour la taille des germes qui apparaissent beaucoup plus petits mais plus nombreux.

Escherichia coli.

L'action de l'acide glutamique aux deux concentrations est défavorable pour ce germe puisque ici le nombre des bactéries va en diminuant à mesure que l'on ajoute "quelque chose" dans la gélose ou la suspension bactérienne ; ni la taille des colonies, ni le temps, ou l'intensité de coloration ne sont modifiés par la gélose ordinaire Difco ou la gélose contenant de l'acide glutamique, mais sur les milieux avec une suspension ne contenant pas d'acide glutamique ni de glucose, une légère amélioration est observée par la présence d'acide glutamique à 1000 γ/ml à la fois dans le liquide de prélèvement et dans la gélose.

Klebsiella pneumoniae.

La quantité de germes dénombrés sur chaque gélose va en diminuant à mesure que la quantité d'acide glutamique augmente mais, par contre, la taille des colonies croît en progression importante. L'intensité de coloration est légèrement augmentée par la présence d'acide glutamique à 1000 γ/ml à la fois dans la gélose et dans la suspension de bactéries. La vitesse de réduction du chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium en formazan est très rapide (2 minutes pour chaque catégorie) et, fait notable, cette réduction est visible à la température ordinaire et non à + 37°C.

Serratia marcescens.

On note une légère augmentation du nombre de microcolonies sur la gélose contenant l'acide glutamique à 1000 γ/ml ensemencée avec la suspension en contenant également ; par contre, la taille des colonies va en décroissant. La vitesse de formation du formazan est la plus rapide enregistrée pour la culture sur la gélose seule : une minute, et elle est encore importante pour les deux autres essais. L'intensité de la coloration est plus grande pour les colonies obtenues sur la gélose seule que pour les deux autres. Cette réduction s'effectue d'ailleurs à froid.

Pseudomonas aeruginosa.

Le nombre de germes obtenus par cette méthode était trop important pour être compté. Leur taille était identique pour la gélose seule et la gélose contenant de l'acide glutamique à 1000 μg/ml et ensemencée avec la suspension contenant de l'acide glutamique ; elle était supérieure pour les germes cultivés sur la boite de Pétri contenant de l'acide glutamique mais en suspension dans le seul liquide tampon phosphaté. La vitesse de réduction est assez lente et est encore diminuée pour la gélose avec acide glutamique et ensemencée avec le prélèvement le contenant : l'intensité de la coloration est faible à partir des trois boites de Pétri.

Bacillus subtilis.

Les quantités de germes obtenues avec la gélose ordinaire et avec celle ensemencée avec le prélèvement contenant l'acide glutamique sont identiques, mais la taille des bactéries est beaucoup plus grande pour cette dernière et surtout les colonies ont un aspect gras qui contraste avec l'aspect habituel des colonies de Bacillus subtilis. Il semble qu'il y ait une légère diminution du nombre avec la gélose contenant l'acide glutamique mais ensemencée avec le prélèvement ordinaire. La vitesse de réduction est très grande et identique pour les trois essais ; seule l'intensité de coloration est plus grande pour le prélèvement contenant l'acide glutamique et ensemencé sur gélose en contenant également à la concentration de 1000 μg/ml.

Pour tous ces essais, il y a lieu de noter que les suspensions contenant les germes à la concentration 10^{-6} ont toutes présenté un développement abondant en 24 heures à l'étuve, lorsqu'elles contiennent de l'acide glutamique aux deux concentrations et du glucose, alors qu'elles n'ont guère changé lorsque les germes sont en contact avec le tampon phosphaté seul.

L'acide glutamique semble quelquefois inhibiteur en ce qui concerne le nombre de germes, mais il est toujours favorable en ce qui concerne la vitesse de réduction du chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium en formazan et l'intensité de la coloration ; ces conditions sont les plus importantes dans la méthode préconisée ; très souvent, les colonies sont plus grosses, ce qui favorise grandement la lecture.

Nous avons pu établir le tableau récapitulatif ci-dessous n° 15.

TABLEAU N° 15

	Staphylococcus aureus	Eberthella typhosa	Salmonella para typhiA	Salmonella para typhiB	Escherichia coli	Klebsiella pneumoniae	Serratia marcescens	Pseudomonas aeruginosa	Bacillus subtilis	Eberthella typhosa avec acide glutam. à 100 µg./ml.	Salmonella paratyphi A idem.	Salmonella paratyphi B idem.
Nombre de germes												
gel. ord. (gélose-prélev.-	1.437	incomptables	incomptables	300	1.300	210	300	incomptables	100		incomptables	
sans (gélose + prélev.-	1.386	"	400	300	1.000	95	300	"	60	135	"	400
avec (gélose + prélev.+	866	" légère inh.	incomptables	200	728	68	350	"	100 très grasses	84		400
Taille												
ord.	0,5 mm.	1,5 à 2 mm.	0,1 mm.	0,5 à 3 mm.	0,5 à 1 mm	2,5à3 mm.	0,5 à 3mm	< 1 mm. 0,5 mm.	3 mm.			
sans	0,5 mm.	1 mm.	0,3 mm.	1 à 2 mm.	0,5 à 1 mm.	3,5	0,5 à 2 mm	1 mm.	3,5 mm.	2 mm.	0,5 mm.	0,1 à 1 mm.
avec	0,5 mm.	0,5 mm.	0,3 mm.	1,5 à 3 mm.	1,5 à 2 mm.	4 mm.	0,1 à 0,5mm	<0,5 mm.	4 mm.	2,5 mm.	0,5 mm.	0,1 à 1 mm.
Temps de coloration à 37°												
ord.	8 mn.	8 mn.	5 mn.	5 mn.	3 mn. à 2 mn		1 mn.	6 mn.	4 mn.		5 mn.	5 mn.
sans	8 mn.	8 mn.	3 mn.	3 mn.	2 mn. froid 2mn		3 mn.	6 mn.	2 mn.	7 mn.	3 mn.	2 mn.
avec	6 mn.	8 mn.	3 mn.	2 mn.	2 mn.	2 mn.	4 mn.	8 mn.	2 mn.	7 mn.	3 mn.	2 mn.
Intensité de coloration												
ord.	++	+	++	++	++	++	+++	++	+++			
sans	++	++	++++	+++	++	++	++	++	+++	++++	++	++
avec	+++	+++	++++	+++	+++	+++	++	++	++++	++++	+++	++
Aspect du liquide de prélèvement après 24 h. à l'étuve												
tampon seul	±		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
tampon + acide glutamique + glucose	+	++	+++	+++	++++	+++	++	++++	++++	+++	+++	+++

N.B. : Avec signifie : acide glutamique + glucose à la fois dans la gélose Difco et la suspension.
Sans signifie : acide glutamique + glucose dans la gélose Difco seule.
Gélose ordinaire signifie gélose Difco bacto antibiotic I sans acide glutamique ni glucose.

A ces essais personnels, il est possible d'ajouter deux publications sur l'action favorisante des sels de tétrazolium vis-à-vis de deux germes : Cornybacterium diphteriae et Mycobacterium tuberculosis.

MONIS et REBACK (99) ont démontré qu'en cultivant Cornybacterium diphteriae 18 à 24 heures sur de la gélose "au soja" avec 5 pour cent de sang humain, et en ajoutant à la surface de la culture une solution à 5 milligrammes d'un sel de tétrazolium, ils obtiennent en 2 minutes une coloration noire très intense alors qu'avec le milieu au tellurit il faut 120 minutes. (Tableau n° 16)

TABLEAU N° 16

Coloration de C. diphteriae avec différents sels de tétrazolium	
NO_2BT (nitro bleu de tétrazolium)	noir d'encre en 2 minutes
INT. (iodo nitro-tétrazolium)	gris devient noir en 1 heure
BT (bleu de tétrazolium)	négatif
NT (néotétrazolium)	négatif
TTC (chlorure de triphényl 2.3.5. tétrazolium)	négatif devient noir en 120 minutes
tellurite de potassium	négatif devient noir en 120 minutes.

La même expérience effectuée avec d'autres espèces bactériennes donne des résultats semblables mais après des temps beaucoup plus longs.

BUBBE (18) a mis au point une technique accélérant de 4 jours en moyenne la lecture des cultures de bacille tuberculeux, souches humaine et bovine. Il ajoute 0,5 ml de solution de chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium, en tampon phosphaté à 50 mg pour cent à des tubes contenant de la glycérine et laissés à + 37°C depuis 10 jours : la glycérine et la présence de diphosphopyridine-nucléotide accélèrent la réduction du sel en formazan visible. Malheureusement, ce procédé n'est pas applicable aux cultures en milieu liquide.

CHAPITRE II

APPLICATION DE LA METHODE A L'ETUDE DE L'AIR D'UNE CUVE EXPERIMENTALE DE 10 m3.

Nous avons été en mesure de vérifier notre méthode dans une cuve étanche d'un volume de 10 m3 permettant l'envoi d'aérosols bactériens ou viraux.

Le germe employé était Serratia marcescens : à partir d'une culture de 24 heures, une suspension en milieu légèrement gélatiné est préparée dans la proportion d'une boite de roux pour 125 ml de milieu : on obtient ainsi une concentration de 10^9 bactéries par ml. 25 ml de cette suspension sont alors envoyés dans la cuve à l'aide d'une pompe : la dispersion totale de l'aérosol est assez longue et dure environ 40 mn. Un hygromètre disposé à l'intérieur de la cuve indique la teneur en humidité de l'air qui, de 60 pour cent au début de l'expérience, passe en cinq minutes à 100 pour cent. A travers un hublot, nous voyons l'atmosphère se saturer rapidement et devenir très trouble du fait du fait du grand nombre de germes envoyés.

Nous avons fait quatre prélèvement successifs, dont un témoin, à des temps et des vitesses différentes car, la pompe ayant donné des signes de fatigue dès le début de l'expérience, nous n'avons pu prélever comme nous le pensions durant 10 mn à un débit de 20 l/mn.

Prélèvement 1 : 5 minutes après le début de l'envoi de l'aérosol à 16 l/mn pendant 6 minutes, soit un total de 96 litres d'air analysé.

Prélèvement 2 : 15 minutes après le début de l'envoi de l'aérosol à 14 l/mn pendant 7 minutes, soit un total de 98 litres d'air analysé.

Prélèvement 3 : 35 minutes après le début de l'envoi de l'aérosol à 14 l/mn pendant 7 minutes, soit un total de 98 litres d'air analysé.

Prélèvement 4 : Témoin de l'air de la pièce qui doit être exempt de Serratia marcescens après l'envoi de l'aérosol dans la cuve si celle-ci est bien étanche ; le débit a été de 20 l/mn pendant 5 minutes, soit un total de 100 litres d'air analysé.

* Mise à notre disposition par le Dr. vétérinaire Ct. BROUILLAUD que nous remercions pour son obligeance.

Chaque flacon servant au prélèvement contenait 90 ml de solution tampon phosphate à pH = 7,2 - 10 ml de solution d'acide glutamique à 1 mg/ml, 0,6 ml de solution de glucose correspondant à 2 mg/ml. Après le prélèvement, le contenu de chaque flacon a été transvasé dans des flacons stériles placés dans la glace, afin de permettre leur transport facile à la Faculté pour la deuxième partie de l'opération.

Avec le liquide de chaque flacon, on effectue quatre filtrations de 10 ml chacune, sur membrane Millipore que l'on place ensuite sur des boites de Pétri contenant du milieu "Difco Bacto Antibiotic I" enrichi avec une solution d'acide glutamique pour obtenir une concentration de 1000 μg/ml et deux gouttes d'une solution de glucose à 33 pour cent et que l'on porte à l'étuve.

Les membranes sont retirées au bout de 3, 4, 6 et 24 heures et portées sur la gélose contenant le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium pour permettre la coloration des germes par réduction de ce corps en formazan. Les membranes sont alors montées sur lame, séchées et examinées à l'immersion.

Les résultats sont les suivants : seules les membranes correspondant aux temps de 3 et 4 heures et le témoin de 6 heures peuvent être examinées au microscope. Pour les trois autres prélèvements de 6 heures, la lecture peut être faite directement à l'oeil nu puisque la membrane est envahie par la culture de Serratia marcescens et que la coloration des germes par le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium la rend encore plus facile en transformant la coloration rosée propre au germe en un rouge très foncé. Les membranes correspondant aux cultures de 24 heures confirment ces résultats ; elles sont recouvertes d'une couche continue de Serratia marcescens. Un autre fait est à noter : la culture de 24 heures correspondant à l'air témoin de la pièce est également bien développée, elle est composée en majorité par Serratia marcescens reconnaissable à sa couleur rose. Si la cuve avait été parfaitement étanche, ce germe n'aurait pas dû se trouver dans l'air ambiant en si grande quantité. On a pu examiner les microcolonies sur cette membrane à l'aide d'une loupe et les évaluer à 15 par carré, soit 1500 par membrane pour un filtrat de 10 ml, ce qui est très loin du nombre initial de 10^9 germes par ml envoyés dans la cuve (soit 10^{14} par m3).

En mettant en culture ce qui reste de la solution témoin de prélèvement, nous retrouvons ces résultats ; par contre, la solution abandonnée à elle -même à la température du laboratoire pendant 24 heures donne une culture très abondante de Serratia marcescens ; on a vérifié par la suite, grâce au biophotomètre, que l'association de l'acide glutamique à la concentration de 1000 μg/ml avec le glucose est très favorable pour la croissance de Serratia marcescens.

On peut récapituler les résultats dans le tableau n° 17.

TABLEAU N° 17

Développement de Serratia marcescens sur membrane Millipore

Temps de culture	Prélèvement 1	Prélèvement 2	Prélèvement 3	Témoin
3 heures	assez nombreuses microcolonies visibles à l'immersion.	id.	id.	quelques microcolonies visibles à l'immersion.
4 heures	Nombreuses colonies visibles à l'immersion.	id.	id.	id.
6 heures	++ Nombreuses colonies très petites visibles à l'oeil nu	+++ Nombreuses colonies envahissant déjà la membrane	+++ Envahissement total de la membrane.	0
24 heures	++++ Envahissement total	++++ Envahissement total	++++ Envahissement total	+++ nombreuses colonies 150/ml.

CHAPITRE III

APPLICATION DE LA METHODE AUX BACTERIES ANAEROBIES.

Nous avons voulu vérifier que notre méthode était généralisable et pouvait s'appliquer également aux germes anaérobies.

Le premier germe utilisé avait été une bactérie isolée dans une expertise et pouvant être rattachée au genre Welchia ; il était anaérobie très strict.

Quatre boites de Pétri ont été utilisées dont trois contenaient en plus du milieu Difco Bacto-Antibiotic I, de l'acide glutamique à différentes concentrations et du glucose à 1 pour cent soit :

une boite à 1000 μ_g/ml d'acide glutamique + 1 pour cent de glucose
une boite à 500 μ_g/ml d'acide glutamique + 1 pour cent de glucose
une boite à 100 μ_g/ml d'acide glutamique + 1 pour cent de glucose
une boite témoin avec rien.

Le germe qui avait été ensemencé au préalable en bouillon est employé tel quel. Sur chaque boite est déposée une membrane Millipore HA sur laquelle est ajouté 0,1 ml de la suspension du germe. Par capillarité, la membrane est entièrement recouverte sans avoir besoin de filtrer. Les boites de Pétri sont mises dans une cloche à vide et le vide réalisé à l'aide d'une trompe à eau : celui-ci est long et difficile à réaliser car il demeure toujours sous la gélose des bulles d'air qui sont aspirées et décollent cette gélose du fond ; celle-ci peut ainsi tomber partiellement ou même entièrement dans le couvercle de la boite de Pétri Pour la même raison, la membrane peut se retrouver seule appliquée contre la paroi de verre du couvercle et le milieu reste inutilisé dans le fond de la boite. Aussi nous avons été amenée à placer les boites de Pétri à l'endroit, c'est-à-dire le couvercle en haut.

Après 24 heures, on aperçoit une culture microbienne très nette sous la gélose entre celle-ci et le verre ; par contre, sur la même membrane, après coloration de celle-ci par passage dans une boite de Pétri sur une gélose contenant du chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium, on n'aperçoit que quelques bactéries isolées et quelques rares microcolonies (à l'oeil nu, aucune culture n'est visible sur ces trois boites).

Le même essai a été effectué en se plaçant dans les conditions mêmes du prélèvement. :

Eau physiologique stérile	20 ml
Suspension du germe dans du bouillon	0,5 ml
Solution d'acide glutamique	1 ml correspondant à une concentration de 1000 µg/ml

Quelques gouttes de solution de glucose à 33 pour cent.

L'ensemble reste une demi-heure à l'étuve à 37°C puis 4 ml sont filtrés sur chaque membrane.

Chaque membrane est traitée ensuite comme précédemment. Les résultats sont les mêmes sur la membrane examinée, après coloration, à l'objectif à immersion, mais il n'y a pas de culture visible à l'oeil nu sur la gélose. IL semble que le germe manque de vitalité, aussi avons-nous fait appel à un autre germe, Clostridium sporogenes 3037.

Nous commençons par vérifier que cette souche se développe parfaitement en 24 h. en bouillon VF sous vide, et en gélose VF si on a soin d'ensemencer le germe dans le milieu liquéfié prêt à se reprendre en masse (+ 40°C environ).

Six boites de Pétri sont utilisées :

- une boite de Pétri contenant de la gélose VF,
- deux boites de Pétri contenant de la gélose VF + de l'acide glutamique à la concentration de 1000 µg/ml,
- une boite de Pétri contenant de la gélose "Difco Bacto-antibiotic I",
- une boite de Pétri contenant du milieu Difco-Bacto-Antibiotic I + de l'acide glutamique à la concentration de 1000 µg/ml + 1 pour cent de glucose.

Sur chacune on dépose une membrane Millipore HA, stérilisée par ébullition de 20 mn dans de l'eau stérile et 4 gouttes de suspension de germes en bouillon prélevées avec une pipette Pasteur. On porte les boites de Pétri dans un dessicateur à vide dans lequel on fait le vide et que l'on porte à l'étuve à + 37°C. Un témoin, boite de Pétri contenant de la gélose VF, est ensemencé avec la même quantité de germes directement dans le milieu. Après 24 h. d'étuve, rien n'est visible sur les membranes, mais le témoin présente une culture bien développée. Après 48 h., toujours aucune culture visible. On ouvre la cloche à vide d'où il s'échappe une odeur caractéristique et on porte les membranes sur le milieu au chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium afin de colorer les germes. L'examen à l'objectif à immersion nous montre quelques bacilles isolés et très peu de microcolonies. Nous avons laissé deux boites de Pétri comme témoins dans la cloche à vide, l'une contenant de la gélose VF avec de l'acide glutamique, l'autre du milieu

"Difco Bacto-Antibiotic I" avec de l'acide glutamique et du glucose ; au bout de cinq jours, les germes semblent avoir peu proliféré, ce que l'on vérifie par la coloration au chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium. Une explication parait plausible : le vide n'est peut être pas assez puissant pour chasser l'air présent dans les pores de la membrane : on sait en effet que dans chaque membrane le volume des pores est de 80 pour cent par rapport à la matière solide qui n'est que de 20 pour cent. La filtration de la suspension microbienne au travers de la membrane permettra peut-être de chasser cet air résiduel plus facilement. Le même essai est effectué mais au lieu de déposer les 4 gouttes de suspension sur la membrane stérilisée par ébullition, 0,2 ml de cette suspension sont filtrés au travers de la membrane . Après 24 h. , pas de culture visible mais odeur caractéristique à l'ouverture de la cloche à vide. Après 48 h. toute la membrane est envahie et une coloration de Gram montre des bacilles Gram positif bien sporulés. Si on prélève une anse de ces germes et qu'on la porte sur la gélose au chlorure de triphényl-2. 3. 5. tétrazolium pendant 20 mn à l'étuve, en examinant ensuite les germes que l'on venait de caractériser très nettement à la coloration de Gram, mais seulement des granules rouges.

Les membranes de 24 heures colorées sur la gélose au chlorure de triphényl 2. 3. 5 tétrazolium donnent l'impression de cocci rouges à l'examen à l'objectif à immersion ; en variant la mise au point, on aperçoit des corps bactériens incolores avec un point rouge au milieu. Cependant cette culture rapide en 48 heures sur membrane sous cloche à vide se révèle très inconstante et il n'est pas possible de donner ce procédé comme efficace.

Nous avons alors essayé la méthode préconisée par SHANK (141) qui consiste à cultiver les bactéries anaérobies en surface sur boite de Pétri en les isolant de l'air par un film de matière plastique. Cette méthode a été décrite la première fois par KNETEMAN (70)en 1957 et était complétée par l'adjonction d'un germe aérobie pour parachever l'anaérobiose. Mais plusieurs points laissaient à désirer : le germe aérobie devait être frais pour chaque essai ; le milieu devait être capable d'assurer la croissance du germe aérobie en plus du germe anaérobie ; la température et le pH étaient limités par la présence du germe aérobie ; certains agents sélectifs employés dans l'isolement des germes anaérobies ne pouvaient être employés. C'est pourquoi SHANK a remplacé les microorganismes aérobies par du thioglycolate et a aussi pu utiliser des antibiotiques pour obtenir des cultures sélectives d'anaérobies à partir de milieux biologiques ou d'aliments.

Le film plastique employé par l'auteur était du Saran (préparé par la DOW CHEMICAL Co, Midland, Mich.) ; SHANK indique qu'il avait un millimètre d'épaisseur pour une transmission d'oxygène de 0,74 ml. par 645 cm^2 par 24 heures. Des cercles d'un diamètre convenable pour couvrir une boite de Pétri étaient découpés, puis mis dans des boites de Pétri où ils étaient stérilisés à l'aide d'oxyde d'éthy-

lène. Les germes étaient ensemencés sur des boites de Pétri et une rondelle de Saran était appliquée à leur surface en prenant bien soin de supprimer à l'aide de pressions légères les petites poches d'air qui auraient pu se former.

En 24 à 48 heures, toutes les souches de Clostridium utilisées par l'auteur s'étaient parfaitement développées. Lorsque nous avons repris cette technique au laboratoire, nous nous sommes heurtés d'abord à l'impossibilité de nous procurer du Saran d'une épaisseur de un millimètre : le représentant français de la Société DOW CHEMICAL ne connaissait pas de Saran de cette épaisseur et une lettre adressée à la maison-mère aux U. S. A. était restée sans réponse. Nous avons dû employer du Saran commercial dont l'épaisseur ne doit pas dépasser un vingtième de millimètre ; de ce fait, il est très difficile à découper car il est très électrostatique : il faut emballer dans du papier chaque rondelle séparément afin de les stériliser et il est parfois peu facile de les étaler à la surface de la gélose. Mais la culture se fait au bout d'un temps plus long : 3 à 4 jours en moyenne ; par contre, si les germes sont filtrés sur membrane Millipore, l'air résiduel des pores est retenu prisonnier sous le Saran et empêche toute culture. Cette méthode, bien que séduisante par sa facilité, a dû être abandonnée.

Nous nous sommes alors tournés vers une technique beaucoup plus ancienne utilisant la boite de BREWER (17). Un milieu contenant des agents réducteurs est coulé dans une boite de Pétri en quantité suffisante pour que le couvercle de Brewer adhère en tous points sur les bords : un minimum de 25 ml est nécessaire pour une boite d'un diamètre de 10 cm; de 40 ml pour une boite de 15 cm. Le centre du couvercle est légèrement surélevé et une petite quantité d'air est enfermée à la surface de la gélose ; l'oxygène qui y est contenu est réduit par le thioglycolate du milieu.

Cependant, il se forme souvent un film humide à la surface du couvercle et cette eau de condensation tend à éparpiller les germes ; dans le cas d'une membrane, ceux-ci peuvent être disséminés hors du champ de la membrane. Pour ces raisons, nous avons écarté cette méthode d'autant que l'air résiduel des pores de la membrane possède le même effet inhibiteur que dans les autres méthodes précédemment décrites.

C'est pourquoi nous avons dû nous résoudre à absorber l'oxygène des pores des membranes Millipore par un germe utilisant pour sa croissance ce même oxygène, c'est-à-dire un aérobie.

La méthode employée, et qui semble nous donner de bons résultats, est dérivée de celle décrite par SNIESZKO (144) qui utilise un matériel très simple : deux boites de Pétri de même diamètre, si possible de 7 centimètres, de la cellophane adhésive Scotch et une culture d'un germe aérobie à croissance rapide.

Dans les boites destinées à recevoir le germe aérobie, il est coulé de la gélose Difco-Antibiotic I, dans celles destinées à l'anaérobie, un milieu dérivé de celui de SHANK mais plus riche, dont la composition est la suivante :

Tryptone Difco	15 g.
Extrait de levure	10 g
Thioglycolate de sodium	2 g
L. Cystine	0,1 g
Glucose	5 g
Bleu de méthylène	0,002 g
Gélose	10 g
Eau distillée	960 ml.

Les sels, la tryptone et l'extrait de levure sont dissous dans une partie de l'eau ; la solution est filtrée dans un ballon contenant la gélose et le reste de l'eau. On porte à ébullition, on ajuste à pH = 7,2 et on stérilise 20 mn à 120°C. On refroidit rapidement le milieu à la sortie de l'autoclave pour éviter une décomposition du thioglycolate.

La quantité de thioglycolate a été fixée d'après le milieu préconisé par BREWER, de même que l'addition de glucose et du bleu de méthylène qui sert d'indicateur : le milieu où les germes n'ont pas encore poussé est d'une belle couleur verte tandis que lorsque la culture a eu lieu, il vire au jaune : le bleu de méthylène coloré est réduit en son leucodérivé incolore.

Les boites de Pétri contenant les deux milieux sont mises à l'étuve pendant 24 à 48 heures afin d'éliminer l'eau de condensation. Une souche de Staphylocoque doré Oxford de 24 heures est émulsionnée dans un tube de bouillon et mise à l'étuve trois heures afin d'ensemencer les boites de Pétri avec un germe en phase optimale de croissance, c'est-à-dire en période d'utilisation maximum d'oxygène. Pendant ce temps, on prépare des dilutions en eau physiologique ou en eau stérile d'une souche de Clostridium sporogenes 3037 de 10^{-1} à 10^{-5} suivant la méthode habituelle ; on stérilise les membranes Millipore par ébullition 20 minutes dans de l'eau stérile, et on filtre sur chaque membrane une des dilutions préparées ci-dessus. Ces membranes sont placées sur les milieux au thioglycolate. On ensemence alors avec la suspension de Staphylocoque qui a été incorporée à quelques centimètres cubes de milieu gélose Difco Bacto Antibiotic I, la surface des boites de Pétri contenant le milieu Difco Bacto Antibiotic I ; chaque boite de Staphylocoque est alors réunie à une boite contenant une membrane par un ruban de cellophane adhésive (la surface des géloses se faisant face) : l'étanchéité est alors suffisante pour permettre la culture du germe anaérobie en 48 à 72 heures à l'étuve à 37°C. Il faut avoir soin de mettre la membrane à la partie supérieure afin d'éviter une projection du germe aérobie sur elle. La culture de l'anaérobie se voit facilement car le milieu de vert devient jaune, ceci étant dû à la réduction du bleu de méthylène, tandis que la membrane se colore en bleu.

Dans le cas des suspensions, les colonies ne paraissent isolées sur la membrane que pour des concentrations de 10^{-4} et 10^{-5} ; elles sont jaunes foncées et on un aspect assez désséché.

L'addition d'acide glutamique ne semble pas apporter une diminution notable du temps de culture.

Lorsque les membranes présentent une culture microbienne à leur surface, les boites sont ouvertes et les membranes portées sur une gélose au chlorure de triphényl 2. 3. . 5. tétrazolium, afin d'essayer de les colorer en rouge : la coloration de la membrane en bleu devrait rendre encore plus sensible la coloration des germes. Or, malgré un séjour prolongé sur la gélose au chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium à l'étuve à + 37°C, la coloration des germes n'a pas lieu ; si on examine entre lame et lamelle une anse de ces bactéries, on retrouve les granules rouges dans le corps bactérien incolore.

Cette méthode est donc applicable aux germes anaérobies telle qu'elle a été préconisée pour les germes aérobies, mais elle présente peu d'intérêt car elle ne permet pas une culture rapide ; d'autre part, la lecture microscopique est beaucoup plus difficile puisque les germes ne se colorent pas entièrement en rouge.

oOo

CONCLUSIONS

L'étude bactériologique de l'air a pris un essor nouveau et a dû être envisagée sous des modalités différentes depuis qu'une éventuelle agression par aérosols de bactéries ne peut être exclue.

Après avoir rappelé l'origine, la nature, la stabilité des bactéries dans l'air et les conditions auxquelles devraient répondre les aérosols bactériens pour une éventuelle action nocive, nous avons étudié les diverses techniques proposées pour recueillir les bactéries, et décrit celle que nous avons mise au point lors de nos essais: barbotage de l'air dans une solution isotonique tamponnée, additionnée de glucose et d'acide glutamique.

Le prélèvement réalisé, il nous fallait trouver une méthode. permettant de mettre en évidence le plus rapidement possible la présence de bactéries capables de proliférer, et d'en préciser la concentration.

Nous avons utilisé les membranes filtrantes "Millipore" pour recueillir les bactéries du prélèvement. Ces membranes sont ensuite portées sur un milieu de culture "riche", permettant un développement rapide des germes, auquel nous ajoutons du glucose et de l'acide glutamique à la concentration de 1 pour mille. Celui-ci entraîne une exaltation des déshydrogénases bactériennes que l'on met en évidence par dépôt ultérieur de la membrane sur une gélose au chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium à 0,2 pour cent portée à + 40°C. L'examen au microscope avec objectif à immersion dans l'huile de cèdre des membranes séchées nous permet d'apercevoir et de dénombrer les microcolonies rouges apparues en quelques heures : 3 à 6 heures selon les germes aérobies soumis à nos essais.

Nous avons étudié au biophotomètre enregistreur de BONET-MAURY-JOUAN le rôle de l'acide glutamique et du glucose dans l'accélération de la croissance des germes. Celle-ci n'est pas toujours en corrélation avec l'activation de la déshydrogénase et l'addition d'acide glutamique doit être donc limitée.

Enfin, nous avons cherché à adapter cette méthode à la détection des bactéries. De très nombreuses techniques ont été essayées. La culture en boite de Pétri double avec un aérobie pour absorber l'oxygène semble la plus valable. Cependant la mise en évidence des microcolonies par le chlorure de triphényl 2. 3. 5. tétrazolium est beaucoup moins nette (petits grains rouges) et donne des résultats beaucoup plus tardivement.

Notre technique ne tendait pas à identifier les germes mais seulement à dénombrer assez rapidement les bactéries vivantes présentes dans l'air. Elle s'intègre dans le processus : alerte immédiate (procédés physiques), détection rapide avec orientation, identification. Les méthodes d'identification rapide par les procédés biochimiques (fermentations) (21) et immunologiques (fluorescence) font l'objet d'autres recherches.

oOo

Vu, le Président de Thèse :
Pr LAMBIN

Vu, le Doyen de la Faculté :
Pr VALETTE

Vu et Permis d'Imprimer
le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE.

BILIOGRAPHIE

1 - AM.J. of PUBLIC HEALTH, Supplément 27, 1937, 97-104.

2 - ANDERSEN A.A., J. Bact., 1958, 76, 471-484, New sampler for the collecting, sizing, and enumeration of viable airborne particles.

3 - ANDERSEN A.A. et ANDERSEN M.R., Appl. Microbiol., 1962, 10, 181-184, A monitor for airborne bacteria.

4 - BAMBERGER E., Ber. Deu. Chem. Ges., 1894, 27, 160-163, Zur Kenntniss des Benzenylamidoxins.

5 - BATEMAN J.B., Mc CAFFREY P.A., O'CONNOR R.J. et MONK G.W., Appl. Microbiol., 1961, 9, 567-571, Relative humidity and the killing of bacteria.

6 - BATTELI F. et STERN L., C.R. Soc. Biol., 1910, 69-2, 552-554, Oxydation des acides malique, fumarique et citrique par les tissus animaux et Biochem. Z., 1911, 31, 478-505, Die Oxydation der Citronen, Apfel und Fumarsaüre durch Tiergewebe.

7 - BERRY C.M., Pub. Hlth Rep., Washington 1941, 56, 2044-2049, An electrostatic method for collecting bacteria from air.

8 - BERRY H. et MICHAELIS I., Quart. J. Pharm. Pharmacol., 1947, 20, 331-348 et 527-537, 1948, 21, 24 et 503. The evaluation of the bactericidal activity of ethylene glycol and some of its monoalkyl ethers against Bacterium coli. Part I et III, Part IV et V.

9 - BESSON, Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, 514-522, Contribution à l'étude bactériologique de l'air à Paris.

10 - BISHOP D.W. et MATHEWS H.P., Science, 1952, 115, 211-212, Inhibition of sperm motility by tetrazolium.

11 - BOLOTOVSKIY V.M., Problèmes de virologie U.R.S.S., 1961, 6, 454-463.

12 - BONET-MAURY P., Ann. Inst. Past., 1946, 72, 966-972. L'étude du titrage de la pénicilline : méthodes des dilutions.

13 - BONET-MAURY P. et WALLEN R.J., Ann. Inst. Past., 1945, 71, 284-291, Photomètre différentiel pour l'enregistrement automatique des courbes de multiplication bactérienne.

14 - BOURDILLON R.B. et Coll., Studies in air hygiene, Londres, His Majesty's Stationery office, 1948, 356 p.

15 - BOURDILLON R.B., LIDWELL O.M. et LOVELOCK J.E., Studies in air hygiene, Med. Res. Council Special Rept series, Londres 1948.

16 - BOURDILLON R.B., LIDWELL O.M. et THOMAS J.C., J. Hyg. Camb., 1941, 41, 197-224. A slit sampler for collecting and counting air borne bacteria.

17 - BREWER J.H., Science, 1942, 95, 587, A new petri dish cover and technique for use in the cultivation of anaerobes and microaerophiles.

18 - BUBBE F.W., Zbl. Bakt. I abt. Orig., 1961, 182, 85-92, Die Besch- leunigung der bakteriellen Tuberkulose Diagnostik mit Hilfe von Triphenyltetrazoliumchlorid.

19 - BUCHBINDER L., SOLOWEY M. et SOLOTOROVSKY M., Heat. Pip. air Cond., 1945, 17, 389.

20 - BUCHNER E., Ber. Deu. Chem. Ges., 1897, 30, 117-124 et 1110-1113, Alkoholische Gärung ohne Hefezellen (2 parties)

21 - BUISSIERE J., LARRIBAUD J. et GIRIER L., Bull. mens. Soc. Med. Mil. Fse, fév. 1964, 58, n° 2, 78-84, Technique rapide d'identification des bactéries.

22 - BULLER A.H.R. et LOWE C.W., Trans. Roy. Soc. Can., 1911, 3ème série, 4, Sect. 4, 41-58, Upon the number of microorganisms in the air of Winnipeg.

23 - Bulletin Atomist Scientist, 1960, 7, 238-240.

24 - BULLOCH W., The history of bacteriology, Clarendon Press, Oxford, 1938, 422 pages.

25 - CARTER C.H. GASPAR A.J. et LEISE J.M., J. Bact., 1956, 71, 623, Resazurin staining of bacterial colonies on membrane filters.

26 - CHAPMAN G.H., J. Bact., 1947, 53, 504 - A superior culture medium for the enumeration and differenciation of coliforms.

27 - CHAPMAN G.H., Amer. J. Pub. Hlth., 1951, 41, 1381, A culture medium for detecting and confirming Escherichia coli in ten hours.

28 - CHICHKIN N.S., Nuages, précipitations et électricité d'orage, Moscou, 1954.

29 - COTTREL M.J., Nature (Londres), 1947, 159, 748, Tetrazolium salt as a seed germination indicator.

30 - COURTOIS J.E. et PERLES R., Précis de Chimie Biologique, Masson et Cie, Paris, 1959, Tome I p. 36, 453 pages.

31 - COWN W.B., KETHLEY T.W. et FINCHER E.L., Appl. Microbiol., 1957, 5, 119-124, The critical orifice liquid impinger as a sampler for bacterial aerosols.

32 - CUNNINGHAM D.D., Microscopic examinations of air, Government Printer, Calcutta, 1873, 58 pages.

33 - DELWICHE E.A., FUKUI G.M., ANDREWS A.W. et SURGALLA M.J., J. Bact., 1959, 77, 355-360, Environmental conditions affecting the population dynamics and the retention of virulence of Pasteurella pestis : the role of carbon dioxide.

34 - DEMUTH F., Arch. fur Zeitforsch., 1931, II, 98.

35 - DOLL W., Zbl. Bakt. II Abt. 1962, 115, 161-163, Verbesserung der bakteriologischen Keimzahlung durch Reduktion von 2.3.5. Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) auf Membranfiltren.

36 - DROZDOVA Z.M., Thèse de candidature, Moscou, 1949, Modifications des colonies de streptocoques hémolytiques en fonction de leurs propriétés biologiques.

37 - DU BUYH H.G., HOLLAENDER A. et LACKEY M.D., Supplement 184 to Public Health Rep. of U.S. Pub. Hlth Ser., 1945, A comparative study of sampling devices for airborne microorganisms.

38 - DUCHENNE J., Thèse Doctorat d'état Pharmacie, Paris, 1961, Des modalités d'action des solvants organiques sur l'évolution des courbes de croissance bactérienne. P. 79 à 84.

39 - EBELING A.H., Proc. Soc. Expt. Biol., 1936, 34, 886.

40 - ECKER R.E. et LOCKHART W.R., J. Bact., 1958, 77, 173-176, A rapid membrane filter method for direct counts of microorganisms from small samples.

41 - ELFORD W.J., J. Path. Bacter., 1931, 34, 505.

42 - ERLICH R., J. Bact. 1955, 70, 265-268, Technique for microscopic count of microorganisms directly on membrane filters.

43 - Von EULER H. et MYRBACK K., Z. Physiol. Chem., 1923, 131, 179-203, Gärungs-Co-Enzym (Cozymase) der Hefe I.

44 - FARR W., in Vital Statistics, Office of Sanitary Institute, Londres, Elevation and cholera mortality in London, 1848-1849.

45 - FIFIELD C.W. et HOFF J.E., Stain Technol., 1957, 32, 95-96, Dilute malachite green : a back-ground stain for the Millipore filter.

46 - FORBES G.J., J. Hyg. Camb., 1924, 22, 123.

47 - FRANKLAND P.F., Phil. Trans. 1887, 178 B, 113-152, A new method for the quantitative estimation of the microorganisms present in the atmosphere .

48 - FREDETTE V., La semaine médicale , 1952, 38ème année, 8 nov.

49 - GAIDAMOVITCH S.Y., VLODAVETS V.V., OBURKHOVA V.R., Problems of Virology U.R.S.S., 1959, n° 4, 396-400, Méthode de captation du virus de la grippe dans un aérosol en gouttelettes 1° Efficacité de la captation du virus de la grippe à l'aide de l'appareil de Diakonov et de filtres solubles de mousse de gélatine.

50 - GIBBS E., Clouds and smokes, P. Blackinson Son and Co, Philadelphia, 1924.

51 - GOETZ A. et TSUNEISHI N., J. Am. Water Works Ass., 1951, 43, 943-984, Application of the molecular filter membrane to the bacteriological analysis of water.

52 - GOODLOW R.J. et LEONARD F.A., Bact. Rev. 1961, 25, 182-187, Viability and infectivity of microorganisms in experimental airborne infection.

53 - GORDON M.H., Rep. Med. Offr. loc. Govt. Bd., 1902-1903, Appendice B, 421.

54 - GRABAR P. et de LOUREIRO J.A. , Ann. Inst. Pasteur, 1939, 63, 159-189, Sur la préparation des membranes ultrafiltrantes.

55 - GREENBURG L. et SMITH G.W., U.S. Bureau of Mines Rept. Invest. n° 2392, 1922, A new instrument for sampling aerial dust.

56 - GREGORY P.H., The microbiology of the athmosphere, Leonard Hill Ltd, Londres 1961, 251 P.

57 - GRIGOR'EVA L.V., Problems of virology, U.R.S.S., 1963, 8, 87-90, Detection d'aérosol de phages par précipitation électrostatique, capteur à barbotage et poudre d'alginate de sodium.

58 - GROSLAUDE G. et HERMIER J., Laboratory Practice, 1961, 10, 889, A sampler for enumeration of airborne microorganisms.

59 - HAMMOND E.C., J. Gen. Microbiol., 1958, 19, 267-270, Ammonium alginate wool as a filter for collecting microorganisms from large volumes of air.

60 - HARDEN A. et YOUNG W.J., Proc. Roy. Soc. London, 1906, 77 B, 405-420, The alcoholic ferment of yeast juice.

61 - HENDERSON D.W. et WOODS D.D., 1942 in ROSEBURY 1947.

62 - HERMIER J., C.R. Acad. Sciences Paris, 1958, 246, 3298-3300, L'activation par la chaleur de la germination des spores de Bacillus subtilis.

63 - HESSE W., Mitth. Kaiserl. Gesundheitsamte, 1884, 2, 182-207, Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthalten Mikroorganismen et Z. Hyg. Infektkr., 1888, 4, 19-21, Bemerkungen zur quantitative Bestimmung der Mikroorganismen in der Luft.

64 - HOLLANDAER A. et DELLA VALLE J.M., Publ. Hlth Rep., 1939 , 54, 574, A simple device for sampling air borne bacteria.

65 - HUDDLESON F. et BALTZER B., Science, 1950, 112, 651-652, Differenciation of bacterial species and variation within species by means of 2.3.5. triphenyltetrazolium chloride in culture medium.

66 - KELLY C.D. et PADY S.M., Canad J. Botany, 1953 , 31, 90-106, Microbioligical studies of air over some non-artic regions of Canada.

67 - KELLY C.D. et PADY S.M., Canad. J. Bot. 1954, 32, 591-600 Microbiological studies of air masses over Montréal during 1950 and 1951.

68 - KETHLEY T.W., COWN W.B. et FINCHER E.L., Appl. Microbiol. , 1957, 5, 1-8, The nature and composition of experimental bacterial aerosols.

69 - KETHLEY T.W., GORDON M.T. et ORR C. Jr., Science, 1952, 116, 368, A thermal precipitation for aerobacteriology.

70 - KNETEMAN A. , J. Appl. Bacteriol., 1957, 20, 101-107, A method for the cultivation of anaerobic spore forming bacteria.

71 - KOCHWESER D., BARCLAY W.R. et EBERT R.H., Am. Soc. for Chem. Invest., 1952, 31, 644, Reduction of tetrazolium by growing tubercle bacilli.

72 - KRONTOWSKI A.A., Arch. exp. Zeitforsch., 1931, II, 93.

73 - KROTOV Y.A., Hygiène et Santé U.R.S.S., 1953, n° 4, 11-15, Nouvel appareil pour l'étude microbiologique de l'air.

74 - KUHN R. et JERCHEL D., Ber. Deu. Chem. Ges., 1941, 74, 942-949, Uber Invertseifen - Tetrazolium Salze.

75 - KUHN R. et JERCHEL D., Ber Deu. Chem. Ges., 1941, 74, 949-952, Uber Invertseifen VIII Mitteil : Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien garende Hefe und keimende Samen.

76 - KUN et ABOOD L.G., Science, 1949, 109, 144-146, Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride.

77 - LAKON G., Mitteilg. Intern. Ver. Samenk., 1940, 12, 1-18.

78 - LAMBIN S., GERMAN A., HUBERT-BRICEAU J. et CARRERE Cl., Ann. Pharm. Franc., 1959, 17, 321-330, Sur la caractérisation dans les extraits de foie de la cyanocobalamine ajoutée.

79 - LEAVITT F.W. et KAYE S., Science, 1956, 123, 934-935, Temperature control in the measurement of particle volumes by the isopiestic method.

80 - LEBENSOHN F., Arch. fur Zeitforsch., 1934, 16, 64.

81 - LUCKIESH M, HOLLADAY L.L. et TAYLOR A.H., General Electric Rev., 1946, 49, n° 3, 8-17, Sampling air for bacterial contents.

82 - LUCKIESH M., TAYLOR A.H., et HOLLADAY L.L., J. Bact., 1946, 52, 55-65, Sampling devices for airborne bacteria.

83 - MADDOX R.L., Monthly Micros. J., 1870, 3, 286-290, On an apparatus for collecting atmospheric particles, et 1871, 5, 45-49, Observations on the use of the aéroniscope, or airdust collecting apparatus.

84 - MAGILL P.L., ROLSTON M., MAC LEOD J.A., CADLE R.D., Anal. Chem., 1950, 22, 1174-1177, Sampling certain athmospheric contaminants by a small scale Venturi scrubber.

85 - MAISONNET. Thèse Doct. Méd. Paris, 1955 et Rev. D'Hyg. Med. Soc., 1956, 4, 228.

86 - MATTSON A.M., JENSEN C.O. et DUTCHER R.A., Science ; 1947, 106, 294-295, Triphenyltetrazolium chloride as a dye for vital tissues.

87 - MAURANGES P., La semaine médicale, 1962, 38e année, 9, 367-370, La flore microbienne de l'air marin.

88 - MAY K.R., J. Sci. Instrum., 1945, 22, 187-195, The cascade impactor : an instrument for sampling coarse aerosols.

89 - MAY K.R., Arch. Indust. Hlth, 1956, 13, 481, A cascade impactor with moving slides.

90 - MAY K.R. et DRUETT H.A., Brit. J. Indust. Med., 1953, 10, 142-151, The pre impinger ; a selective aerosol sampler.

91 - MAY K.R. et HARPER G.J., Brit. J. Indust. Med., 1957, 14, 287-297, The efficiency of various liquid impinger samplers in bacterial aerosols.

92 - MEYERHOF O., Arch. ges Physiol. (Pflüger's), 1919, 175, 20-88.

93 - MILYAVSKAYA P.F., Hyg. et Santé U.R.S.S., 1945, N° 6, 30.

94 - MILL H.R. et LEMPFERT R.K., Quart. J. Roy. Meteorol., 1904, 30, 57.

95 - MIQUEL P., Annu. Obs. Montsouris, 1879-1899 et Les organismes vivants de l'atmosphère Gautier-Villars, Paris 1883, 310 p.

96 - MIQUEL P., Ann. Inst. Pasteur, 1888, 2, 364-373, Des procédés usités pour le dosage des bactéries atmosphériques.

97 - MITCHELL P., Biochem. J., 1957, 65, 44. Stucture and function in microorganisms.

98 - MITCHELL R.B., TIMMONS H.W., DORRIS H.W., J. Aviation 1951, 22, 214-224, Studies on microorganisms of the upper athmosphere. I Development of methods and material.

99 - MONIS B. et REBACK J.F., Proc. Soc. Exp. Biol., 1962, III, 81-84, Tetrazolium salts and identification of Cornybacterium diphteriae.

100 - MONOD J., Cité dans Microbiologie Médicale de Moustardier G. 1954, Tome I, p. 31-34, Librairie Maloine Paris.

101 - MOULTON S., PUCK T. et LEMON H., Science, 1943, 97, 51-52, An apparatus for determination of the bacterial content of air.

102 - MUDD S., Extrait du Symp. 6e Congrès Inter. ROME, 1953.

103 - MUDD S., BRODIE A.E., WINTERSCHEID L.C., HARTMAN P.E., BEUTNER E.H. et Mc LEAN R.A., J.Bact. 1951, 62, 729-737, Further evidence of the existence of mitochondria in bacteria.

104 - MUDD S., WINTERSCHEID L.C., DE LAMATER E.D. et HENDERSEN H.J., J. Bact., 1951, 62, 459-475. Evidence suggesting that the granules of Mycobactéria are mitochondria.

105 - MUROMTSEV S.N. et NENECHEV V.P., Zh. Mikrobiol. Epidemiol Immunobiol. U.R.S.S., 1960, n° 10 53-56.

106 - NORDMANN J., NORDMANN R. et GAUCHERY O., Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 1826-1835, Détermination de l'activité déshydrogénasique des mitochondries à l'aide de chlorure de 2.3.5. triphényltétrazolium.

107 - O'CONNEL D.C., WIGGINS N.J.B., PIKE G.F., Science, 1960, 131, 359, New technique for the collection and isolation of airborne microorganisms.

108 - OGAWA K. et OKAMOTO M., Tex. Rep. Biol. Med. 1961, 19, 134-139, Histochemical demonstration of succinic deshydrogenase system in tissue culture.

109 - ORR C. Jr, GORDON M.T., KORDECKI M.C., Appl. Microb., 1956, 4, 116-118, Thermal precipitation for sampling air borne microorganisms .

110 - PARADO, Bull. Féder. Franç. Amicales Pharm. Réserve, 1958, 52, 63.

111 - PASTEUR L., C.R. Acad. Sci. (Paris) 1860, 50, 303-307 Expériences relatives aux générations dites spontanées .

112 - PASTEUR L., Ann. Sci. Nat. (Zool.) 4ème série 1861, 16, 5 - 98, Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère. Examen de la doctrine des générations spontanées.

113 - PAVLOVSKIY, 1885, in KROTOV Y.A.

114 - VON PECHMAN H., Ber., Deu. Chem. ; Ges., 1892, 25, 3175-3190, Ueber die Einwirkung von Diazobenzol auf Malonsaüre.

115 - VON PECHMAN H., Ber. Deu. Chem. Ges., 1894, 27, 320-324, Ueber die Bildungsweisen der Formazyl-verbindungen.

116 - VON PECHMAN H. et RUNGE P., Ber. Deu. Chem. Ges., 1894, 27, 2929-2930, Oxydation der Formazyl-verbindungen.

117 - PERKINS W.A. et VAUGHAN L.M., Bact. Rev., 1961, 25, 347-355, Public Health implications of airborne infection.

118 - PETRI R.J., Z. Hyg. Infektkr., 1888, 3, 1-145, Eine neue methode Bacterien und Pilzsporen in der Luft nachzuweisen und zu zählen.

119 - PHELPS E.B. et BUCHBINDER L., J. Bact., 1941, 42, 321-344, Studies on microorganisms in simulated room environments. 1° A study of the performance of the Wells air-centrifuge and of the settling rates of bacteria through the air.

120 - PLOMMET M., Ann. Inst. Nat. Rech. Agro. série E (Ann. Technol. Agric.) 1956, 5, 493-519, L'ébullition domestique du lait, son action sur la flore microbienne et les constituants du lait.

121 - POLLARD A.L., Science, 1946, 103, 758-759, An useful selective bactericidal property of Tergitol 7.

122 - POSTGATE J.R., CRUMPTON J.E. et HUNTER J.R., J. Gen. Microbiol., 1961, 24, 15-24, The mesurements of bacterial viabilities by slide culture.

123 - RAZUMOV A.A., Mikrobiol, 1933, 2, 346-352, New methods for the quantitative and qualitative studies of water microflore.

124 - REMY H., in FUKS N.A., Mécanique des aérosols, Moscou, 1955.

125 - RETCHMENSKIY S.S., MITTCHENKO V.P., Problems of virology, U.R.S.S., 1958, n°2, 101.

126 - RETCHMENSKIY S.S. et STCHAVELEVA A.P., J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1945, 1-2, 78.

127 - RICHARDS M., Nature, Londres, 1955, 176, 559-560, A water soluble filter for trapping airborne microorganisms.

128 - RICHARDS O.W. et KRABEK W.B., J. Bact., 1954, 67, 613, Visibilizing microorganisms on membrane filter surface.

129 - ROBERTSON S.M., BIGG E., MILLER B.F. et BAKER Z., Science, 1941, 93, 213, Stérilisation of air by certain glycols employed as aerosols.

130 - ROMENS-HOMAIRE M., Thèse Doctorat Université Pharmacie Strasbourg, 1954, 77 p., Etude enzymatique et isolement des microorganismes à l'aide d'un sel de tétrazolium.

131 - ROSEBURY T., Experimental airborn infection, Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1947, 222 p.

132 - SAITO K., J. Coll. Sci. Tokyo, 1904, 18, 58 pages, Untersuchungen über die atmosphärischen Pilzkeime I Mitt. et 1908, 23 1-78, II Mitt.

133 - SALISBURY J.H., Amer. J. Med. Sci., 1866, 51, 51-75, On the cause of intermittent and remittent fevers, with investigations which tend to prove that these affections are caused by certain species of Palmella.

134 - SANARELLI G., 1891, in J. Am. Water Works Ass., 1951, 45, 943-984.

135 - SAROTCHINSKAYA L.S., Thèse de candidature, Léningrad, 1957, Sur les microorganismes témoins pour l'air des locaux hospitaliers et leur destruction par les rayons ultra-violets.

136 - SATORY et LANGLOIS, Poussières et Microbes de l'air, Poinat, Paris, 1912.

137 -SCHAEFFER R., Ann. Inst. Pasteur, 1963, 105, 326-331, L'activité déshydrogénasique comme mesure de l'activité biologique globale des sols.

138 - SCHAPIRA G., Eléments de Biochimie, Flammarion, Paris, 1958, p. 147, 225 p.

139 - SEVAG M.G. et FORBES M., Arch. Biochem., 1950, 29, 229-230, Oxydative interaction between glucose and nitrogenous substances.

140 - SHANAHAN A.J., FORNWALD R.E., CHAPMAN D.M. et BEACHLEY A.N., J. Bact., 1956, 71, 499-500, Visualizing bacterial cells for direct microscopic counting on the Millipore filter, hydrosol type.

141 - SHANK J.L., J. Bact., 1963, 86, 95-100, Applications of the plastic film technique in the isolation and study of anaerobic bacteria.

142 - SHIPE E.L., TYLER M.E. et CHAPMAN D.N., Appl. Microbiol. 1959, 7, 349-354, Bacterial aerosol samplers. 2° Development and evaluation of the Shipe sampler.

143 - SINEL'NIKOVA E.P., J. Mikrobiol., épidémiol. immounol. U.R.S.S., 1963, 40, 49-53, Filtres liquides à mousse pour la détection d'aérosols microbiens.

144 - SNIESZKO S., Centr. Bakteriol., II Abt., 1930, 82, 109-110, The growth of anaerobic bacteria in petri dish cultures.

145 - SRIKANTAN T.N., AGARWALA S.C. et SHRIVASTAVA D.L. Ind. J. Med. Res., 1957, 45, 467 - 474, Studies in the enzyme make-up of Pasteurella pestis - V Dehydrogenase activity of virulents and avirulent strains.

146 - STRAUSS F.H., CHERONIS N.D. et STRAUSS E., Science, 1948, 108, 113-115, Demonstration of reducing enzym systems in neoplasms and living mammalian tissues by triphenyltetrazolium chloride.

147 - TCHISTOVITCH G.N., Exposés de l'Institut de Médecine expérimentale de l'Académie des Sciences médicales de l'U.R.S.S. Conférence sur le bilan des travaux effectués en 1953, Léningrad 1954, 2ème partie, 67.

148 - THUNBERG T., Skand. Arch. Physiol., 1910, 24, 23.

149 - TORLONI M. et BORZANI M., Appl. Microbiol., 1958, 6, 252-254, A filtration method for the determination of concentration of microorganisms in air.

150 - TYLER M.E. et SHIPE E.L., Appl. Microbiol. 1957, 7, 337-349, Bacterial aerosol sampler, 1° Development and evaluation of the all-glass impinger.

151 - VERCHIGORA A.E., Méthodes de recherches microbiologiques sur les aérosols, Kiew, 1960.

152 - VERNE J., HEBERT S., et TORDET-CARIDROIT C., C.R. Soc. Biol., 1962, 156 6, 1085-1088, Activités tetrazolium-réductrices des cultures de fibroblastes. I Choix du sel de tetrazolium et influence du milieu de culture.

153 - VLODAVETS V.V., J. Mikrobiol. Epidemiol. Immounobiol. 1963, 40, 46-50.

154 - WARBURG O. et CHRISTIAN W., Biochem. Z., 1931, 242, 206-227, Uber Aktivierung der Robinsonschen Hexose-Mono-Phosphorsaüre in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen.

155 - WAUGHT T.D., Science, 1948, 107, 275, Staining of the stem system of plants by triphenyl-tetrazolium chloride.

156 - WAYNE L.G., J. Bact., 1955, 69, 92-96, Cultivation and visualization of mycobacteria on molecular filter membrane.

157 - WEBB S.J., Can. J. Microbiol., 1959, 5, 649-669, Factors affecting the viability of airborne bacteria.

158 - WEBB S.J., Can J. Microbiol., 1960, 6, 89-105, Factors affecting the viability of air-borne bacteria III The role of bonded water and protein structure in the death of air-borne cells.

159 - WEINBERG E.D., J. Bact., 1953, 66, 240-242, Selective inhibition of microbial growth by the incorporation of triphenyl-tetrazolium chloride in culture media.

160 - WELLS W.F., Amer. J. Publ. Hlth., 1933, 29, 58-59.

161 - WELLS W.F. - Airborne contagion and air hygiene : an ecological study of droplet infections, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1955, 423 p.

162 - WEYGAND F. et FRANK I., Z. Naturforschg., 1948, 3 b, 377-379, Ueber die Einwirkung von Licht auf Tetrazolium Verbindungen : Tetrazolium Typie I Mitt.

163 - WHEELER S.M., FOLEY G.E. et JONES T.D., Science, 1941, 94, 445-446, A bubbler pomp method for quantitative estimation of bacteria in the air.

164 - WILLIAMS R.E., LIDWELL O.M. et HIRCH A., J. Hyg. Camb., 1956, 54, 512-523, The bacterial flora of the air of occupied rooms.

165 - WILSON H., JACKSON E.B., BRUES A.M., J. Gen. Physiol. 1942, 25, 689-703, The metabolism of tissues cultures : preliminary studies on chick embryo.

166 - WINLING E., Thèse Doctorat Université Pharmacie Strasbourg 1953, Etude biologique des bacilles acido-alcoolo-résistants, Emploi d'un nouvel indicateur de réduction, le chlorure de 2,3,5. triphényltétrazolium, 100 p.

167 - YAROCHENKO V.A., J. Mikrobiol. Epidemiol. Immounobiol. 1961, 32, 64-68, Estimation comparative des méthodes de détection des coccis pathogènes dans l'air des locaux hospitaliers.

168 - ZENTNER R.J., Bact. Rev., 1961, 25, 188-193, Techniques of aerosols formation.

169 - ZSIGMONDY R. et BACHMANN W., Z. Schr. f. anorg. u. allgem. Chem., 1918, 103, 119-128, Uber neue Filter.

ACEMP